

**Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie  
der  
Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor : Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)**

# **Entwicklung einer neuen Methode zur Isolierung von Cobalt-Chrom-Abrieb aus dem Gewebe um gelockerte Endoprothesen**

Kerstin Korth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger
2. apl. Prof. Dr. Dr. H. P. Rechl

Die Dissertation wurde am 10.01.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.05.2003 angenommen.

## **Gliederung:**

1. Einleitung
2. Materialien und Methoden
  - 2.1 Gewebe
    - 2.1.1 Gewebeart
    - 2.1.2 Kriterien der Patientenauswahl
  - 2.2 Isolation der Metallpartikel
    - 2.2.1 Salzsäure
      - 2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung der Salzsäure
        - 2.2.1.1.1 5%ige Salzsäure
        - 2.2.1.1.2 10 %ige Salzsäure
      - 2.2.2 Kochen des Gewebes
      - 2.2.3 Waschen
        - 2.2.3.1 Waschgänge
      - 2.2.4 Konzentrationsbestimmung
        - 2.2.4.1 Atomabsorptionsspektroskopie
      - 2.2.5 Trocknen
      - 2.2.6 Wiegen
      - 2.2.7 Autoklavieren
    - 2.3 Zellkultur
      - 2.3.1 Zelllinie
      - 2.3.2 Wachstumsbedingungen
      - 2.3.3 Medium
        - 2.3.3.1 FCS
        - 2.3.3.2 Vitamine
        - 2.3.3.3 Antibiotika
    - 2.4 Tests
      - 2.4.1 LDH-Test
        - 2.4.1.1 zellbiologische Hintergründe
        - 2.4.1.2 Testprinzip
        - 2.4.1.3 Durchführung
      - 2.4.2 MTT-Test
        - 2.4.2.1 Zellbiologische Hintergründe
        - 2.4.2.2 Testprinzip
        - 2.4.2.3 Durchführung
      - 2.4.3 Tryptan-Blau-Test
        - 2.4.3.1 Testprinzip
        - 2.4.3.2 Durchführung
    - 2.5 Versuche
      - 2.5.1 Wachstumskurve
        - 2.5.1.1 Ansatz
        - 2.5.1.2 Ansetzen der Flaschen
        - 2.5.1.3 Abtrypsinieren
        - 2.5.1.4 Zellzählung
          - 2.5.1.4.1 Prinzip
          - 2.5.1.4.2 Durchführung
      - 2.5.2 Negativkontrollen

- 2.5.2.1 Benutzung von Nativgewebe ohne Metallexposition
  - 2.5.2.1.1 Ansatz
  - 2.5.2.1.2 Durchführung
- 2.5.2.2 Ausschluss einer schädigenden Wirkung von Salzsäure
  - 2.5.2.2.1 Ansatz
  - 2.5.2.2.2 Metallstaub
  - 2.5.2.2.3 Versuchsplanung
    - 2.5.2.2.3.1 Zellberechnung
    - 2.5.2.2.3.2 Vorbereitung
    - 2.5.2.2.3.3 Zellzählung
    - 2.5.2.2.3.4 Herstellung der Zellkonzentrationen
    - 2.5.2.2.3.5 Präparieren der Lochplatten
    - 2.5.2.2.3.6 Metallstaub
    - 2.5.2.2.3.7 Herstellen der Metallkonzentrationen
      - 2.5.2.2.3.7.1 Verdünnungsreihen
      - 2.5.2.2.3.8 Beschicken der Zellen
- 2.5.3 Auflösen des Patientenmaterials

### 3. Ergebnisse

- 3.1 Wachstumskurve
- 3.2 Negativkontrollen
  - 3.2.1 Ausschluss der schädigenden Wirkung von HCl
    - 3.2.1.1 LDH-Test mit HCl nach 72h
    - 3.2.1.2 LDH-Test mit HCl nach 96h
    - 3.2.1.3 LDH-Test ohne HCl nach 72h
    - 3.2.1.4 LDH-Test ohne HCl nach 96h
    - 3.2.1.5 MTT-Test mit HCl nach 72h
    - 3.2.1.6 MTT-Test mit HCl nach 96h
    - 3.2.1.7 MTT-Test ohne HCl nach 72h
    - 3.2.1.8 MTT-Test ohne HCl nach 96h
    - 3.2.1.9 Tryptan-Blau-Test mit HCl nach 72h
    - 3.2.1.10 Tryptan-Blau-Test mit HCl nach 96h
    - 3.2.1.11 Tryptan-Blau-Test ohne HCl nach 72h
    - 3.2.1.12 Tryptan-Blau-Test ohne HCl nach 96h
  - 3.2.1.2 Problem des Materialverlustes
  - 3.2.2 Negativkontrolle mit Nativgewebe
- 3.3 Metallkonzentrationen im Patientengewebe

### 4. Diskussion

### 5. Zusammenfassung

### 6. Literaturliste

### 7. Lebenslauf

### 8. Danksagung

## 1. Einleitung

Die Suche nach Ursachen von Osteolysen um Endoprothesen ist ein Gebiet, welches seit Jahren zu den Hauptforschungsgebieten der Orthopädie zählt. Obwohl die klinischen Ergebnisse zunächst gut sind, kommt es nach 15 Jahren bei 74-86 % der Patienten (11) zu aseptischen Lockerungen, die dann einen Endoprothesenwechsel erfordern.

Trotz intensiver Forschung sind Ätiologie und Pathogenese von Lockerung und Osteolyse noch nicht vollständig geklärt, da die Zusammenhänge äußerst komplex sind. Man vermutet, dass durch Metallabrieb und Korrosion (16) der Implantate im umliegenden Gewebe eine komplexe aseptische entzündliche Reaktion entsteht (5, 6), bei der Osteoblasten, Makrophagen und Lymphozyten Cytokine, Prostaglandine und proteolytische Enzyme sezernieren (3), bzw. Osteoklasten aktivieren (11) was dann zu Osteolysen bzw. zur Lockerung des Implantats führen kann.

Auch Druck, der durch die täglichen Bewegungen auf dem Implantat lastet, soll Makrophagen aktivieren (4).

Zu der lokalen Wirkung von Metallabrieb kommt auch noch eine systemische. Es konnten in Leber, Milz und abdominalen Lymphknoten erhöhte Partikelkonzentrationen nachgewiesen werden, die in einzelnen Fällen sogar mit einer eingeschränkten Leberfunktion einhergingen (17).

Inwieweit die Osteoblasten durch diesen Metallabrieb geschädigt werden, soll Teil dieser Arbeit werden.

Viele Arbeiten haben sich bis jetzt mit diesem Thema auseinandergesetzt um die Reaktionen der Osteoblasten auf Metallpartikel in vitro zu simulieren (8, 16, 18) und genauer zu erforschen. Bei diesen Arbeiten wurde allerdings mit industriell hergestellten Cobalt-Chrom-Partikeln gearbeitet. Es können also nicht die Verhältnisse wie im menschlichen Organismus vorliegen. Bei Vergleichen des Durchmessers der industriell hergestellten Partikel mit Partikeln, die aus Patientengewebe isoliert wurden, zeigten sich Differenzen. Die aus Patientengewebe gewonnenen Partikel waren  $0,5\mu\text{m}$  und kleiner (10), die industriell hergestellten Partikel aber  $1,5\mu\text{m}$  und grösser (12).

Aufgrund der Hypothese, daß Metallabriebpartikel im Interfacegewebe um aseptisch gelockerte Endoprothesen regelmässig nachgewiesen werden und diese Partikel Zellkulturen in unterschiedlichen Ausmass schädigen, besteht das Ziel dieser Doktorarbeit darin, eine geeignete Methode zur Isolierung von Metallabrieb aus dem Gewebe um Prothesen zu entwickeln. Anhand dieses Materials wären dann bei Exposition von Zellen und Durchführung einiger Tests realistischere Aussagen über die Reaktionen von Zellen auf Metallabrieb zu machen.

Zwar gibt es einige Arbeiten über die Isolation von Metall-Partikeln aus dem Gewebe um Metall-Endoprothesen, jedoch dienten sie fast nur dazu, diese Partikel zu quantifizieren, deren Grösse zu bestimmen und untereinander zu vergleichen, nicht jedoch um in einem weiteren Schritt mit ihnen weiter zu arbeiten (13, 14, 2, 1, 9, 10). Es wurden NaOCl (1), Salpetersäure (9) sowie Papain (10) zur Auflösung des Gewebes verwendet, die genauen Details der Isolierungsschritte blieben jedoch ungenannt.

Mit dieser neuen Methode dürfen die Partikel nicht geschädigt werden. Negativkontrollen mit industriell hergestelltem Cobalt-Chrom-Staub müssen dies ausschliessen.

Nebenbei soll im Rahmen dieser Negativkontrollen eine eigene Aussage über die schädigende oder nicht schädigende Wirkung von Cobalt-Chrom-Partikeln gemacht werden.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Gewebe**

#### **2.1.1 Gewebeart**

Es handelt sich bei dem verwendeten Gewebe um Neokapsel- und Interfacegewebe, das perioperativ bei Hüft- und Knieendoprothesenwechseln entnommen wurde und postoperativ sofort bis zur weiteren Verarbeitung bei minus 80°C eingefroren wurde. Gründe für die Entnahme sind der direkte Kontakt zu den Prothesen und die in einigen Fällen schon makroskopisch sichtbare Schwarzfärbung des Materials.

#### **2.1.2 Kriterien der Patientenauswahl**

Verwendet wurde nur Gewebe von Patienten mit

- Cobalt-Chrom-Endoprothese
- aseptischer Lockerung der Endoprothese
- radiologisch sichtbaren Lockerungszeichen.

Ausgeschlossen wurde dagegen Gewebe von Patienten mit

- Tumor-Endoprothesen
- Sepsis
- Endoprothesenbruch

### **2.2 Isolation der Metallpartikel**

Es stellten sich beträchtliche Schwierigkeiten bei der Partikelisolierung ein. Der Weg zum Erfolg führte durch eine beträchtliche Versuchsreihe.

#### **2.2.1 Salzsäure**

Durch wage Hinweise aus der Literatur kam die Idee, es mit Säure zu versuchen. Salzsäure wurde dabei bisher nicht verwendet. Neu ist auch, das Gewebe in der Säure zu kochen (s.u.). Wir verwendeten 39%ige rauchende Salzsäure.

##### **2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung der Säure**

Um die geeignete Konzentration der Salzsäure zu bestimmen, stellten wir eine Verdünnungsreihe mit Wasser her und kochten das Gewebe bei unterschiedlichen Temperaturen.

#### **2.2.1.1.1 5%ige Salzsäure**

Auf einen Teil HCl wurden 8 Teile Wasser gegeben, was eine 5%ige HCl ergibt. Das Gewebe wurde nun bei 150°C 1h gekocht (siehe 2.2.2). Das Ergebnis war nicht zufrieden stellend, das Gewebe löste sich nicht vollständig auf.

#### **2.2.1.1.2 10%ige Salzsäure**

Auf einen Teil HCl wurden 4 Teile Wasser gegeben, was eine 10%ige HCl ergibt. Gewebe wurde nun

- bei 150°C für 1h gekocht
- bei 200°C für 1h gekocht und
- bei 200°C für 2h gekocht (siehe 2.2.2).

Das optimale Ergebnis erhält man mit 10%iger Salzsäure und zweistündiger Kochzeit. Es entsteht dabei eine dunkelbraune homogene Flüssigkeit in der keine Gewebereste mehr zu erkennen sind.

### **2.2.2 Kochen des Gewebes**

Nachdem das bloße Einlegen des Gewebes in Salzsäure kein befriedigendes Ergebnis ergab, sprich das Gewebe sich nur ungenügend auflöste, kam die Idee, sie zu erhitzen.

Das Gewebe wurde in Gläschen gegeben, mit Salzsäure vollständig bedeckt und unter der Abzugshaube auf einer gewöhnlichen Kochplatte erhitzt.

Wie in Punkt 2.2.1.1.2 ersichtlich, ist eine Temperatur von 200°C dafür am geeignetsten, die Salzsäure beginnt bei dieser Temperatur gerade zu kochen.

Bei höheren Temperaturen besteht die Gefahr, dass die Gläschen zerspringen.

Während der zweistündigen Kochzeit (siehe 2.2.1.1.2) ist ständig Salzsäure nachzugeben, da diese mit der Zeit verkocht.

### **2.2.3 Waschen**

Nachdem eine bräunliche homogene Flüssigkeit entstanden ist, muss diese von Rückständen gereinigt werden und das Metall herausisoliert werden. Verwendet wurde dazu eine Zentrifuge und destilliertes Wasser.

#### **2.2.3.1 Waschgänge**

Die Metallisolierung wird folgendermassen durchgeführt:

- die abgekühlte Flüssigkeit wird in 2ml-Reaktionsgefäße pipettiert
- die 2ml-Reaktionsgefäße werden in eine Tischzentrifuge gegeben und 30 min. bei 13000U/min zentrifugiert
- Die 2ml-Reaktionsgefäße werden herausgenommen und der Überstand abpipettiert
- Mit destilliertem Wasser werden die 2ml-Reaktionsgefäße bis zur 2ml-Grenze wieder aufgefüllt und erneut in die Zentrifuge gegeben

Durch eine Versuchsreihe wurde herausgefunden, wie viele Waschgänge benötigt werden, um einen klaren Rückstand zu erhalten:

Es stellte sich heraus, dass nach 5 Waschgängen die trüben Rückstände befriedigend beseitigt sind.

Laut Literatur (9) werden durch einen eingebauten Waschgang mit Aceton Polyethylen-Reste herausgewaschen.

Im Ganzen heißt das:

- 1. zentrifugieren, abpipettieren, mit Acqua dest. Auffüllen
- 2. zentrifugieren, abpipettieren, mit Acqua dest. Auffüllen
- 3. zentrifugieren, abpipettieren, mit Aceton auffüllen
- 4. zentrifugieren, abpipettieren, mit Acqua dest. auffüllen,
- 5. zentrifugieren, abpipettieren, mit Puffer auffüllen

## **2.2.4 Konzentrationsbestimmung**

Der Inhalt der 2ml-Reaktionsgefäße wird nun in ein grosses Gefäß zusammenpipettiert. Ca.2ml werden abpipettiert und zur Konzentrationsanalyse in die Atomabsorptionsspektroskopie gegeben.

### **2.2.4.1 Atomabsorptionsspektroskopie**

Die Atomabsorptionsspektroskopie ist ein aus der Flammenspektroskopie entwickeltes Verfahren, mit der man Metallspuren analysieren kann.

Grundprinzip ist das Phänomen der Resonanzabsorption, d.h. ein Lichtquant welches durch ein angeregtes Atom emittiert wird, wird durch ein nicht angeregtes Atom des gleichen Elements absorbiert.

Es wird also durch den Dampf der Analyseprobe das Licht des in der Probe gesuchten Elementes geschickt und im positiven Fall ist die absorbierte Menge direkt proportional der in der Probe enthaltenen Metallmenge.

Die Bestimmung der Menge wird mit einem Absorptionsflammenphotometer durchgeführt.

### **2.2.5 Trocknen**

Für Negativkontrollen die durchgeführt wurden, wurde industriell hergestellter Cobalt-Chrom-Staub verwendet. Er durchlief die gleiche Behandlung wie das Patientenmaterial, sprich Salzsäure und Hitze, sowie das fünfmalige Waschen.

Der Unterschied besteht nur darin, dass er nicht in die Atomabsorptionsspektroskopie gegeben wird, sondern zur weiteren Verwendung erst einmal wieder getrocknet wird.

Dazu werden die 2ml-Reaktionsgefäße über nacht in einen Thermo-Schüttler gegeben, der bei 37°C alle 5 min. eine Minute schüttelt. Die 2ml-Reaktionsgefäße bleiben dabei geöffnet.

### **2.2.6 Wiegen**

Wichtig ist, dass die 2ml-Reaktionsgefäße vor ihrem Gebrauch gewogen wurden, da die verschiedenen 2ml-Reaktionsgefäße nicht das identische Gewicht haben, was beim wiegen im mg-Bereich verständlich ist.

Die 2ml-Reaktionsgefäße werden nun einzeln gewogen, das Gewicht des 2ml-Reaktionsgefäßes abgezogen und die Metallstaubmenge aufgeschrieben.

### **2.2.7 Autoklavieren**

Um den Staub auf die Zellen zu geben, muss er vorher von Keimen befreit werden um das Zellwachstum nicht falsch zu beeinflussen.

Hierzu kommen die 2ml-Reaktionsgefäße in einen Autoklaven, wo sie bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert werden.

## **2.3 Zellkultur**

### **2.3.1 Zelllinie**

Die verwendeten Zellen heissen SAOS-Zellen. Es handelt sich hierbei um Osteosarkomzellen einer 15-jährigen Patientin.

Der Grund für die Verwendung von Sarkomzellen ist, dass aus eigener Erfahrung Sarkomzellen gegenüber humanen Osteoblasten besser zu kultivieren sind und schneller wachsen.

### **2.3.2 Wachstumsbedingungen**

Die Zellen wuchsen in einem Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung.

### **2.3.3 Medium**

Das verwendete Medium ist das MEM (modified Eagle'sMedium) von Biochrom KG mit 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g high D-Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutaminen und ohne Na-Pyrovate.

Dazu wurden folgende Stoffe dazugegeben:

#### **2.3.3.1 FCS**

Der Anteil an fetalem Kälberserum beträgt 10 %. Zellen wachsen mit dessen Hilfe besser, da im fetalen Kälberserum viele Wachstumsfaktoren enthalten sind.

#### **2.3.3.2 Vitamine**

Der Anteil an Vitaminen am Medium beträgt 1 %. Verwendet wurden je 100mg/l Folsäure, Cholin-CL, Nikotinsäureamid, D-CA-Panthotenat, Pyridoxal-HCl, sowie 10mg/l Thiamin-HCl und Riboflavin und 200 mg/l I-Inositol.

#### **2.3.3.3 Antibiotika**

Um die Gefahr von möglichen Keimen in der Zellkultur zu bannen, werden 1 % Antibiotika in das Medium gegeben. Gemeinsam verwendete Antibiotika sind hier Penicillin und Streptomycin.

#### **2.3.4 Mycoplasmen-Testung**

Mycoplasmen sind sehr verbreitete Kontaminanten von Zellkulturen. Durch den Befall der Zellkulturen verändern sie den Stoffwechsel, das Wachstum, die Lebensfähigkeit und die Morphologie der Zellen, das heißt, sie machen aussagekräftige Tests mit den Zellen unmöglich.

Aus diesem Grunde wurden die verwendeten Zellen auf Mycoplasmen untersucht. Der verwendete Test basiert auf der ELISA-Technik und beinhaltet polyklonale Antikörper zum Nachweis der am meisten verbreiteten Mycoplasmen. (Mycoplasma Detection Kit von Roche). Laut Hersteller können mit diesem Test 94 % aller Kulturen gefunden werden. Selbstverständlich wurden bei den folgenden Tests nur Mycoplasma-negative Zellen verwendet.

### **2.4 Tests**

#### **2.4.1 LDH-Test**

##### **2.4.1.1 Zellbiologische Hintergründe**

Die Lactatdehydrogenase ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches Bestandteil jeder Zelle ist und für die Dehydrierung von L-2-Hydroxymonocarbonsäuren und die Katalyse der Reaktion Pyruvat-Lactat zuständig ist. Bei Beschädigung der Zellmembran gelangt es ins Blut oder in diesem Fall in das Medium und gibt so Meldung über die stattgefundenene Zellschädigung.

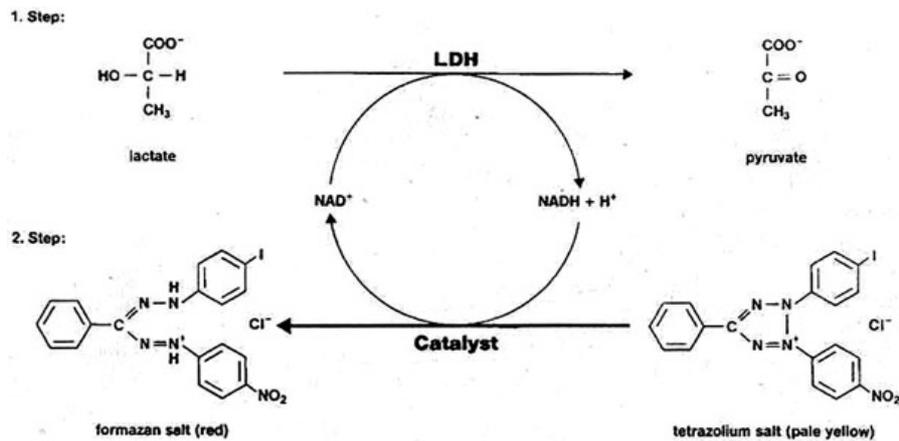
##### **2.4.1.2 Testprinzip**

Verwendeter Test ist der LDH-Test von Roche.

Die Reaktion zur Erfassung der Enzymaktivität erfolgt in zwei Schritten:

Im ersten Schritt wird Lactat zu Pyruvat umgewandelt, wobei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}$  reduziert wird.

In einem zweiten Schritt werden die zwei Wasserstoffatome auf Tetrazoliumsalz übertragen, welches somit zu Formazan reduziert wird. Diesen Farbstoff kann man messtechnisch erfassen.



### 2.4.1.3 Testdurchführung

- Die Platten werden 15 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert um einen zellfreien Überstand zu bekommen
- In dieser Zeit wird die Lösung hergerichtet wobei pro 96-Loch-Platte 250µl aus Flasche 1 und 11,25 ml aus Flasche 2 zusammengegeben werden
- Der Überstand wird nun auf eine neue Platte pipettiert (100µl pro Loch)
- Je 100µl der Reaktionslösung werden nun pro Loch auf die Platte gegeben
- Während der folgenden 30 Minuten dauernden Einwirkzeit müssen die Platten lichtgeschützt bei Raumtemperatur stehen
- Die Reaktion wird mit 50µl N Salzsäure pro Loch abgestoppt
- Mit Hilfe eines ELISA-Readers werden die Ergebnisse bei 490 oder 492 nm gemessen

### 2.4.2 MTT-Test

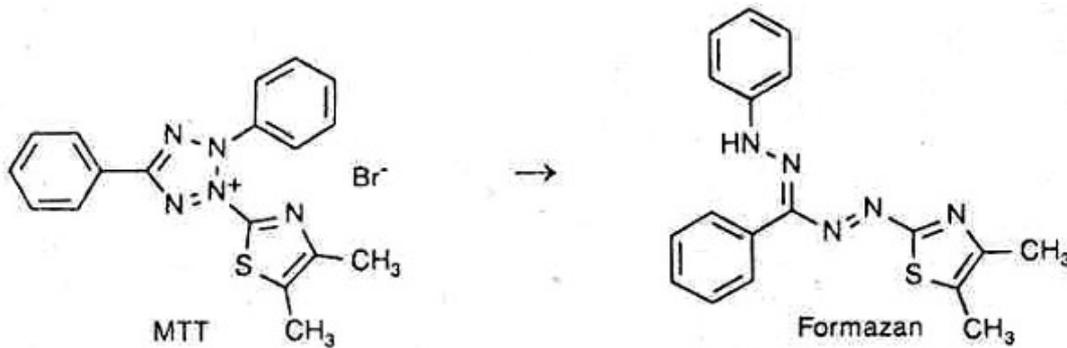
Es handelt sich um einen colorimetrischen Zytotoxizitätstest nach Mosmann (13)

#### 2.4.2.1 Zellbiologische Hintergründe

Die Enzymaktivität die mit diesem Test gemessen wird, ist die der Succinatdehydrogenase. Es ist ein mitochondriales Enzym des Citratzyklusses welches durch Dehydrierung die Umwandlung von Succinat zu Fumarat katalysiert, eng mit der Atmungskette verbunden ist und somit Aufschluss über die metabolische Aktivität von Zellen gibt.

#### 2.4.2.2 Testprinzip

Der verwendeten Reagenzien wurden von Boehringer Mannheim hergestellt. Grundprinzip dieses Testes ist die wasserstoffabhängige Umwandlung des gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid) zu lila Formazankristallen.



Diese Kristalle sind löslich und die entstandene gefärbte Lösung durch einen ELISA-reader messbar. Die Wasserstoffatome der Reaktion entstammen aus der unter 2.4.2.1 genannten Reaktion und somit erhält man indirekt Aufschluss über den Grad der metabolischen Aktivität.

### 2.4.2.3 Testdurchführung

- Es werden 10µl des Tetrazoliums Salzes pro Loch auf die Platten gegeben, dies muss steril geschehen
- Die Platten werden für 4h bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung in den Inkubator gegeben
- Ebenfalls steril werden nun je 100µl der Solubilisationslösung pro Loch pipettiert
- Die Platten werden über nacht bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert
- Am nächsten Tag werden die Platten mit einem Filter zwischen 550 und 600 nm im ELISA-Reader gemessen

## 2.4.3 Tryptan-Blau-Test

### 2.4.3.1 Testprinzip

Prinzip dieses Testes ist die Tatsache, dass Tryptanblau negativ geladen ist und somit gesunde Zellmembranen nicht durchdringen kann. Ist die Zellmembran jedoch geschädigt, gelangt der Farbstoff in die Zelle, färbt sie an und gibt somit Aufschluss über sterbende Zellen. Verwendet wurde Tryptan-Blau 0,5% (m/v) in physiologischer Kochsalzlösung von Biochrom.

### 2.4.3.2 Testdurchführung

- die Zellen werden wie unter 2.5.1.3 abtrypsiniert
- Je 0,5 ml pro Loch werden in 2ml-Reaktionsgefäße pipettiert
- Nun wird die gleiche Menge, also 0,5 ml der Tryptan-Blau-Lösung dazu gegeben
- die Einwirkzeit sollte nicht die Marke von 10 Minuten überschreiten, da sonst die Blaufärbung auch die gesunden Zellen betrifft, bzw. die Differenzierung schwer fällt. Optimal sind 5 Minuten.

- Nun beginnt die Zellzählung die mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt wird
- Mit einer 20 µl-Pipette wird nach Schütteln und Suspensieren der Zell-Trypanblau-Mischung das Feld der Zählkammer bedeckt
- Unter dem Lichtmikroskop wird nun gezählt wie unter 2.5.1.4
- Blaue und weisse, bzw. gefärbte und ungefärbte Zellen werden gesondert gezählt

## **2.5 Versuche**

### **2.5.1 Wachstumskurve**

Bevor man beginnt mit Zellen zu arbeiten, sollte man wissen mit „welchem Alter“ sie am besten wachsen, bzw. die höchste Proliferationsrate haben. Zu diesem Zweck wurde zu Beginn eine Wachstumskurve erstellt.

#### **2.5.1.1 Ansatz**

Das Zellwachstum wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Dazu werden 7 Flaschen mit Zellen angesetzt, inkubiert und je eine Flasche pro Tag ausgezählt.

#### **2.5.1.2 Ansetzen der Flaschen**

Es beginnt nun das sterile arbeiten unter einem Abzug. Bevor man beginnt, sollte man alle Utensilien mit 70%igem Alkohol reinigen. Diese Utensilien sind ein Bunsenbrenner, Medium, Trypsin und Puffer. Diese Flüssigkeiten müssen zum Gebrauch Raumtemperatur haben. Die verwendeten Zellkultur-Flaschen sind 50 ml- Flaschen.

- Eine bereits vorhandene Flasche mit Zellen wird abtrypsiniert (siehe 2.5.1.3)
- In die 7 sterilen Flaschen werden nun je 0,5 ml der Zellsuspension pipettiert
- Pipetten werden immer nur einmal verwendet und die Flaschenhalse danach immer über dem Bunsenbrenner abgeflammt
- Auf die Zellen gibt man nun je 4,5 ml Medium
- In einem Inkubator werden sie bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung bebrütet
- Nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 h werden die Zellen dann gezählt

#### **2.5.1.3 Abtrypsiniieren**

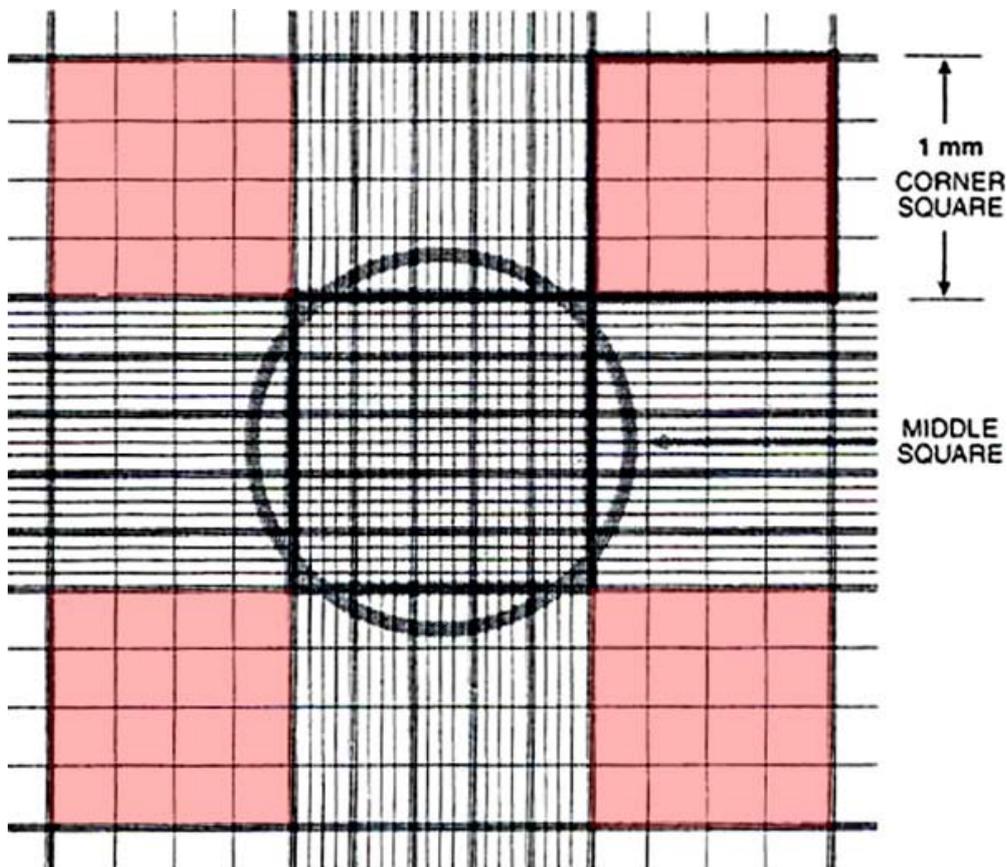
Zellen wachsen immer auf Oberflächen, vor allem auf Plastik, das heisst um sie zählen zu können, muss man sie erst von diesen Oberflächen ablösen. Hier erfolgte das mit Hilfe von Trypsin-EDTA (0,5g Trypsin und 0,2g EDTA pro Liter modifizierter Puck's Salzlösung von Gibco BRL).

- Zuerst wird das alte Medium abpipettiert
- 2 ml Puffer werden in die Flaschen pipettiert
- Die Flaschen werden leicht durchgeschwenkt, sodass der Puffer überall hingelangt
- Er wird dann wieder abpipettiert
- Nun werden 2 ml Trypsin in die Flaschen pipettiert
- Für 2 Minuten werden sie in den Inkubator gegeben
- Mit 2 ml Medium wird das Trypsin nun neutralisiert, damit es die Zellen nicht angreifen kann
- Die Flaschen werden nun geschüttelt um alle Zellen von den Flaschenwänden zu lösen
- Um sie nun zählen zu können werden ca. 0,5 ml in ein 2ml-Reaktionsgefäss abgefüllt

#### 2.5.1.4 Zellzählung

Wie schon in 2.4.3.2 erwähnt, wird die Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Nachdem die Zellen zwischen Zählkammer und Objektglas pipettiert sind, beginnt die Zählung unter dem Lichtmikroskop.

##### 2.5.1.4.1 Prinzip



Gezählt werden die Zellen die sich in den 4 markierten äusseren Quadraten befinden. Bei Zellen die sich auf den Aussenlinien befinden, werden nur die berücksichtigt, die sich auf den nach aussen liegenden Linien befinden und nicht die , die sich auf den inneren Linien befinden.

Teilt man nun die Zellzahl durch 4, da es ja 4 Quadrate sind, und nimmt das Ergebnis mal  $10^4$ , so erhält man die Zellzahl pro ml.

#### **2.5.1.4.2 Durchführung**

Wie in 2.1.4.1 beschrieben wurde die Zellkonzentration so nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden gezählt:

### **2.5.2 Negativkontrollen**

#### **2.5.2.1 Benutzung von Nativgewebe ohne Metallexposition**

##### **2.5.2.1.1 Ansatz**

Um ein Vergleichsergebnis für die Auflösung von metallexponiertem Gewebe zu haben und um sicherzustellen, dass die Auflösungsmethode mit Salzsäure rein makroskopisch das Gewebe völlig auflöst und damit rein optisch darauf hinweist, dass Rückstände bei metallexponiertem Gewebe Metallpartikel sind, wurde eine Negativkontrolle angesetzt in der Hüftgelenks-Kapselgewebe ohne Metallexposition genommen und unter genau den gleichen Bedingungen wie metallexponiertes Gewebe mit Salzsäure aufgelöst und gewaschen.

##### **2.5.2.1.2 Durchführung**

Das Kapselgewebe das intraoperativ gewonnen wurde, wurde wie in 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben mit Salzsäure gekocht bzw. aufgelöst und gewaschen.

#### **2.5.2.2 Ausschluss einer schädigenden Wirkung von Salzsäure**

##### **2.5.2.2.1 Ansatz**

Um sicherzustellen, dass 10 %ige Salzsäure nicht eine schädigende Wirkung aufweist, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, in der einmal Zellen mit HCl-exponiertem Cobalt-Chromstaub und einmal mit nicht HCl-exponiertem Cobalt-Chromstaub beschickt wurden. Nach 72h und 96h wurde die Viabilität mit Hilfe des LDH-, MTT- und Tryptan-Blau-Testes untersucht.

Durch den Nachweis, dass die Ergebnisse nicht relevant differieren, kann man die schädigende Wirkung ausschliessen.

### 2.5.2.2.2 Metallstaub

Wegen des Materialmangels (siehe 3.3) musste diese Negativkontrolle mit industriell hergestelltem Cobalt-Chromstaub durchgeführt werden.

### 2.5.2.2.3 Versuchsplanung

#### 2.5.2.2.3.1 Zellberechnung

Für MTT-Test und LDH-Test wurden 96-Loch-Platten verwendet.

Bei 2 Ablesezeitpunkten macht das 2 Platten pro Test, also 4 96-Loch-Platten insgesamt:

| -HCl.exponierter Metallstaub- |      |      |       |       |       |     |      |      |  |    |
|-------------------------------|------|------|-------|-------|-------|-----|------|------|--|----|
|                               | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |    |
|                               | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |    |
|                               | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  | NK |
|                               |      |      |       |       |       |     |      |      |  | NK |
|                               |      |      |       |       |       |     |      |      |  | NK |
|                               | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  | NK |
|                               | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  | NK |
|                               | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  | NK |

-nicht HCl-exponierter Metallstaub-

- Bei 3fach-Bestimmung, Metallkonzentrationen von 10, 50, 100, 200, 500ng, 1, 10 und 50 µg, Beschickung mit und ohne HCl-exponiertem Metallstaub und 6 Negativkontrollen macht das eine Plattenbelegung von 54 Löchern
- Pro Loch wurde eine Zellzahl von 5000 Zellen festgelegt. Die eher gängige Belegung mit 10 000 Zellen wurde nicht eingehalten, da sie 96h ohne Platzschwierigkeiten leben müssen
- Gebraucht werden also 5000 x 54 Zellen, macht 270 000 Zellen pro Platte, bei 4 Platten insgesamt macht das 1 080 000 Zellen, aufgerundet 1 500 000 Zellen alleine für den LDH- und MTT-Test

Beim Tryptan-Blau-Test werden 12- Loch-Platten verwendet.  
Bei Benötigung von 2 Platten pro Tag und 2 Ablesezeitpunkten macht das 4 12-Loch-Platten insgesamt.

Mit HCl-exponiertem Metallstaub

|        |     |      |       |
|--------|-----|------|-------|
| 100 ng | 1µg | 10µg | 500µg |
| 100ng  | 1µg | 10µg | 500µg |
| NK     | NK  |      |       |

Ohne HCl-exponiertem Metallstaub

|        |     |      |       |
|--------|-----|------|-------|
| 100 ng | 1µg | 10µg | 500µg |
| 100 ng | 1µg | 10µg | 500µg |
|        |     |      |       |

- Bei 2fach-Bestimmung, 4 verschiedenen Metallkonzentrationen mit und ohne HCl-exponiertem Staub und 2 Negativkontrollen macht das eine Plattenbelegung von 18 Löchern bei 2 Platten
- Da die 12-Lochplatten viel grösser sind (3,8cm<sup>2</sup>), werden mehr Zellen pro Loch gebraucht: 5 000 Zellen ~ 0,32 cm<sup>2</sup> (96-Loch-Platte)  
? Zellen ~ 3,8 cm<sup>2</sup> (12-Loch-Platte) ?  
also : 5 000/0,32 x 3,8 = 59 375, also ca. 50 000 Zellen pro Loch
- Bei 18 Löchern mit 50 000 Zellen pro Loch und 2 Ablesezeitpunkten, sprich insgesamt 4 Platten macht das 1 800 000 Zellen insgesamt, also ca. 2 000 000 Zellen

Zellen müssen sich immer im Medium befinden, deshalb gilt die Zellberechnung auch bei den 96-Loch-Platen pro Loch pro 100µl und bei den 12-Lochplatten pro Loch pro 1ml.

Es müssen also Konzentrationen von 1,5 Mio. Zellen in insgesamt 30 ml Medium ( 5,4 ml pro Platte, bei 4 Platten sind das 21,6 ml) für die 96-Lochplatten und 2 Mio. Zellen in 40 ml (36ml bei 4 Platten) hergestellt werden. Es wird immer aufgerundet, da es besser ist, mit Materialüberschuss zu arbeiten.

#### 2.5.2.2.3.2 Vorbereitung

Ehe man die Zellen zählen kann um sie anschliessend auf den Platten auszusäen, muss man sie in Zellkulturflaschen wachsen lassen.

Wie die Wachstumskurve zeigt, ist die Proliferationsrate zwischen 48h und 96h am höchsten. Aus diesem Grund werden die frisch angefertigten Zellkulturflaschen 48h bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung bebrütet, ehe sie ausgesät werden.

#### **2.5.2.2.3.3 Zellzählung**

Der erste Schritt ist die Zellzählung in den 48h bebrüteten Zellkulturflaschen.:

- Dazu werden die Zellen zunächst abtrypsiniert (siehe 2.5.1.3)
- Die Zellen werden in ein 20ml –Röhrchen gegeben
- Aus den Röhrchen werden ca. 0,5 ml für die Zählung abgezweigt
- Die Röhrchen werden 15 min. zentrifugiert
- Der Überstand wird abzentrifugiert und übrig bleiben nur die Zellen.
- Die Zählung der Zellen erfolgt wie unter 2.5.1.4 mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer
- Man muss das Ergebnis noch mit der Menge an Millilitern multiplizieren, die vor dem Abpipettieren da waren, da die Formel immer nur die Zellzahl für einen Milliliter ausrechnet.

#### **2.5.2.2.3.4 Herstellung der Zellkonzentrationen**

Um pro Loch 5 000 Zellen in 100 µl bzw. 50 000 Zellen in 1 ml pipettieren zu können, muss man nach Ausrechnen der Zellzahl (siehe 2.5.2.2.3.3) eine Verdünnungsreihe herstellen.

Beispiel:

Wenn nun innerhalb eines Röhrchens 2 860 000 Zellen gezählt werden, so werden sie zu 3 000 000 aufgerundet. Auf die Zellen gibt man nun 60 ml Medium. Pipettiert man nun 30 ml wieder heraus, erhält man eine Konzentration von 1 500 000 Zellen in 30 ml Medium, genau der Konzentration die für den MTT- und LDH-Test gebraucht werden.

Selbstverständlich geschehen all diese Handlungen steril unter dem Abzug.

#### **2.5.2.2.3.5 Präparieren der Lochplatten**

Wenn nun alles ausgerechnet ist und die Zellkonzentrationen hergestellt sind, kann man mit dem Aussäen der Zellen auf die Platten beginnen.

- Mit einer 100 µl-Pipette werden in die Löcher der 4 96-Lochplatten die Zellen gegeben
- Mit einer 1ml-Pipette werden in die Löcher der 4 12-Lochplatten die Zellen gegeben
- Über nacht werden die Platten in den Inkubator gegeben

#### **2.5.2.2.3.6 Metallstaub**

Wie schon erwähnt, musste wegen des Mangels an aus Patienten gewonnenem Metallabrieb industriell hergestellter Metallstaub verwendet werden. Es wurde Staub und nicht Partikel verwendet, um den Grössenunterschied zu natürlich entstandenem Abrieb zu minimieren. Sinn dieser Negativkontrolle ist es ja, die schädigende Wirkung von Salzsäure auszuschliessen, deshalb muss ein Teil des Metallstaubes auch die gleiche Behandlung wie das Patientengewebe erfahren.

- Es werden 4 2ml-Reaktionsgefäße mit je 1g Cobalt-Chrom-Staub abgewogen
- Zwei dieser 2ml-Reaktionsgefäße werden nun wie in 2.2.2 beschrieben mit Salzsäure gekocht
- Es folgen die 5 Waschschrirte (2.2.3), die alle 4 2ml-Reaktionsgefäße durchgehen, also auch der unbehandelte Metallstaub
- Es folgen das trocknen (2.2.5), erneutes wiegen (2.2.6) und autoklavieren.(2.2.7)

### 2.5.2.2.3.7 Herstellen der Metallkonzentrationen

Auch hier wurden die Konzentrationen mit Hilfe einer Verdünnungsreihe hergestellt. Erster Schritt dazu ist die Berechnung der gesamten Konzentration:

-HCl.exponierter Metallstaub-

|  |      |      |       |       |       |     |      |      |  |  |    |
|--|------|------|-------|-------|-------|-----|------|------|--|--|----|
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  |    |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  |    |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  | NK |
|  |      |      |       |       |       |     |      |      |  |  | NK |
|  |      |      |       |       |       |     |      |      |  |  | NK |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  | NK |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  | NK |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  | NK |

-nicht HCl-exponierter Metallstaub-

Pro 96-Loch-Platte braucht man eine Konzentration von 185µg HCl-exponierten Metallstaub und 185µg nicht HCl-exponierten Metallstaub.Macht also bei 4 Platten je 742 µg.

Mit HCl-exponiertem Metallstaub

|        |     |      |       |
|--------|-----|------|-------|
| 100 ng | 1µg | 10µg | 500µg |
| 100ng  | 1µg | 10µg | 500µg |
| NK     | NK  |      |       |

Ohne HCl-exponiertem Metallstaub

|        |     |      |       |
|--------|-----|------|-------|
| 100 ng | 1µg | 10µg | 500µg |
| 100 ng | 1µg | 10µg | 500µg |
|        |     |      |       |

Da beim Tryptan-Blau-Test die Platten ca. um den Faktor 10 grösser sind, sind auch die Metallkonzentrationen, im Vergleich zu den zwei anderen Tests, so hoch angesetzt. Wegen des grossen Materialverbrauchs, vor allem der Menge an Zellen, wurden hier nur 4 Konzentrationen bestimmt sowie diese nur in 2fach-Bestimmung. Gebraucht werden hier ~1mg pro Platte HCl-exponierten Metallstaubes und ~1mg nicht exponierten Metallstaubes. Macht insgesamt aufgerundet 5mg pro 4 Platten und pro Metallstaubart.

Nun beginnt man steril unter dem Abzug die Verdünnungsreihe herzustellen. Man beginnt dabei von oben nach unten, das heisst, man stellt zuerst die höchste Konzentration her und verdünnt sie dann immer mehr bis zur kleinsten geforderten Konzentration.

#### 2.5.2.2.3.7.1 Verdünnungsreihe von LDH-und MTT-Test

Die grösste Konzentration hier sind 50µg. Die Metallkonzentrationen sollen immer in 100 µl Medium sein. Erstes Ziel ist es also nun eine Konzentration von 50µg Metallstaub pro 100µl Medium herzustellen.

Aus den 2ml-Reaktionsgefässen wird nun dasjenige ausgesucht, mit dessen Metallmenge leicht zu rechnen ist.

In diesem 2ml-Reaktionsgefäss wird dann die sogenannte Stocksolution hergestellt.

Bsp.:

Hat dieses 2ml-Reaktionsgefäss nun eine Metallmenge von 3400µg, so geht man folgendermassen vor:

- In dieses 2ml-Reaktionsgefäss wird 1ml Medium gegeben
- Abgerundet ergibt sich so eine Konzentration von 3000 µg pro ml
- Es werden 100µl herauspipettiert und in ein 2ml-Reaktionsgefäss gegeben
- Pipettiert man nun 500µl Medium dazu erhält man eine Konzentration von 300µg pro 600ml bzw. 50µg pro 100µl
- Pipettiert man nun 100µl heraus und gibt 400µl Medium dazu, erhält man eine Konzentration von 10µg pro 100µl
- Pipettiert man nun 100µl heraus und gibt 900µl Medium dazu, erhält man eine Konzentration von 1µg pro 100µl
- Pipettiert man nun 100µl heraus und gibt 100µl Medium dazu, erhält man eine Konzentration von 500g pro 100µl
- Pipettiert man nun 100µl heraus und gibt 200µl Medium dazu, erhält man eine Konzentration von 200g pro 100µl
- Pipettiert man nun 100µl heraus und gibt 100µl Medium dazu, erhält man eine Konzentration von 100g pro 100µl

- Pipettiert man nun 100µl heraus und gibt 100µl Medium dazu, erhält man eine Konzentration von 50g pro 100µl
- Pipettiert man nun 100µl heraus und gibt 400µl Medium dazu, erhält man eine Konzentration von 10g pro 100µl

Die 2ml-Reaktionsgefäße müssen sich die ganze Zeit in einem Schüttler befinden, damit die Metallpartikel sich nicht am Boden absetzen können.

Nach dem gleichen Schema wird bei dem Tryptan-Blau-Test verfahren, nur dass wegen der grösseren Konzentrationen alles mit dem Faktor 10 multipliziert werden muss.

Selbstverständlich müssen die Verdünnungsreihen einmal mit und einmal ohne HCl-exponiertem Cobalt-Chrom-Staub durchgeführt werden.

### 2.5.2.2.3.8 Beschicken der Zellen

Die Platten mit den seit 24h wachsenden Zellen werden nach folgendem Schema beschickt:

#### LDH- und MTT-Test

##### -HCl.exponierter Metallstaub-

|  |      |      |       |       |       |     |      |      |  |  |    |
|--|------|------|-------|-------|-------|-----|------|------|--|--|----|
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  |    |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  |    |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  | NK |
|  |      |      |       |       |       |     |      |      |  |  | NK |
|  |      |      |       |       |       |     |      |      |  |  | NK |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  | NK |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  | NK |
|  | 10ng | 50ng | 100ng | 200ng | 500ng | 1µg | 10µg | 50µg |  |  | NK |

##### -nicht HCl-exponierter Metallstaub-

#### Tryptan-Blau-Test

##### Mit HCl-exponiertem Metallstaub

|        |     |      |       |
|--------|-----|------|-------|
| 100 ng | 1µg | 10µg | 500µg |
| 100ng  | 1µg | 10µg | 500µg |
| NK     | NK  |      |       |

##### Ohne HCl-exponiertem Metallstaub

|        |      |       |        |
|--------|------|-------|--------|
| 100 ng | 1 µg | 10 µg | 500 µg |
| 100 ng | 1 µg | 10 µg | 500 µg |
|        |      |       |        |

Dabei wird folgendermassen vorgegangen:

- Nach Herstellung der ersten Metallkonzentration wird das Medium der dafür vorgesehenen Lochreihe abpipettiert
- Die entsprechende Metallkonzentration wird sofort in die Lochreihe pipettiert, da die Zellen nicht zu lange ohne Medium sein sollten
- So werden alle Platten der Reihe nach beschickt und in den Inkubator gegeben
- Nach 72 und 96h werden die Ergebnisse dann mittels ELISA-Reader abgelesen.

### **2.5.3 Auflösen des Patientenmaterials**

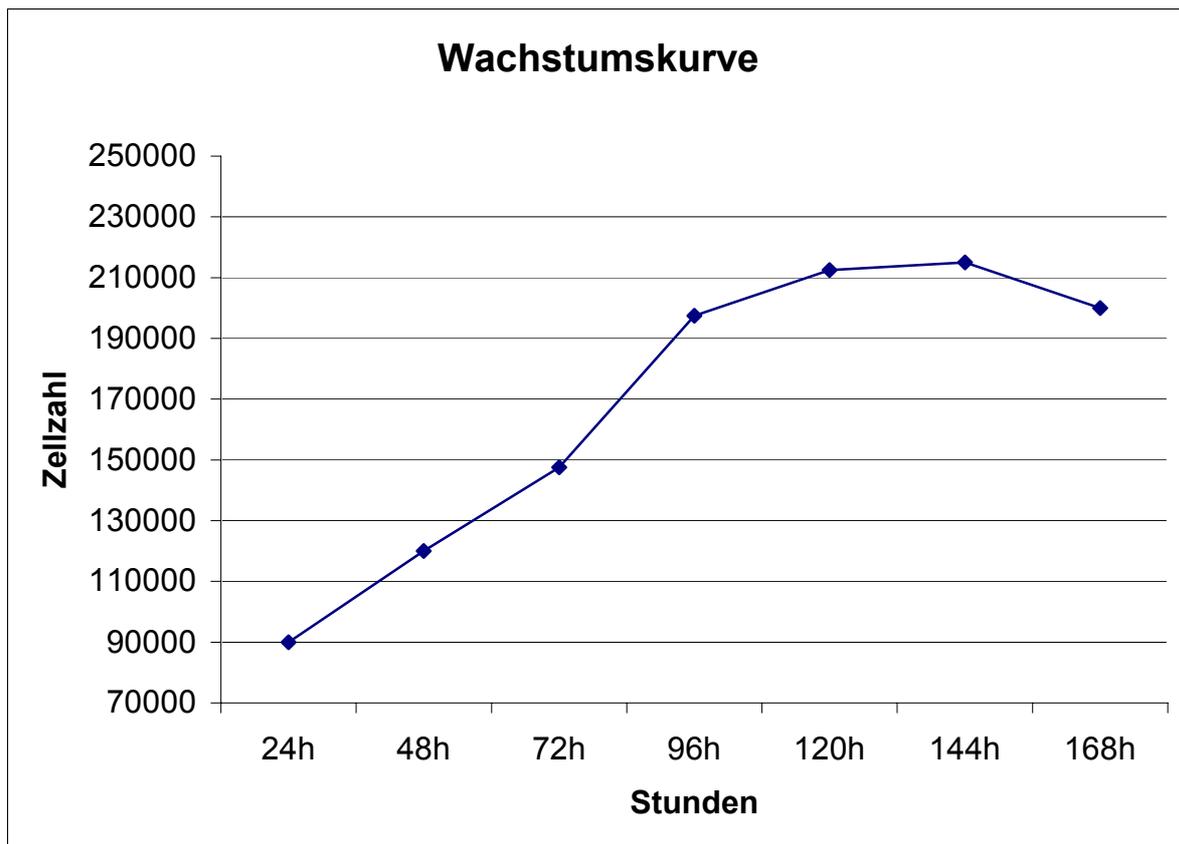
Wie in 2.2 beschrieben, wurde Gewebe, das bei einem Endoprothesenwechsel gewonnen wurde, aufgelöst, um den vermuteten Metallabrieb, der im Laufe der Jahre entstanden war, zu isolieren.

Es wurde Material von insgesamt 3 Patienten gewonnen, von denen zwei eine Hüftendoprothese und einer eine Knieendoprothese hatten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumskurve

|             | <b>gezählte Zellen</b> | <b>Zellzahl(n/4x10000)</b> |
|-------------|------------------------|----------------------------|
| <b>24h</b>  | 36                     | 90000                      |
| <b>48h</b>  | 48                     | 120000                     |
| <b>72h</b>  | 59                     | 147500                     |
| <b>96h</b>  | 79                     | 197500                     |
| <b>120h</b> | 85                     | 212500                     |
| <b>144h</b> | 86                     | 215000                     |
| <b>168h</b> | 80                     | 200000                     |

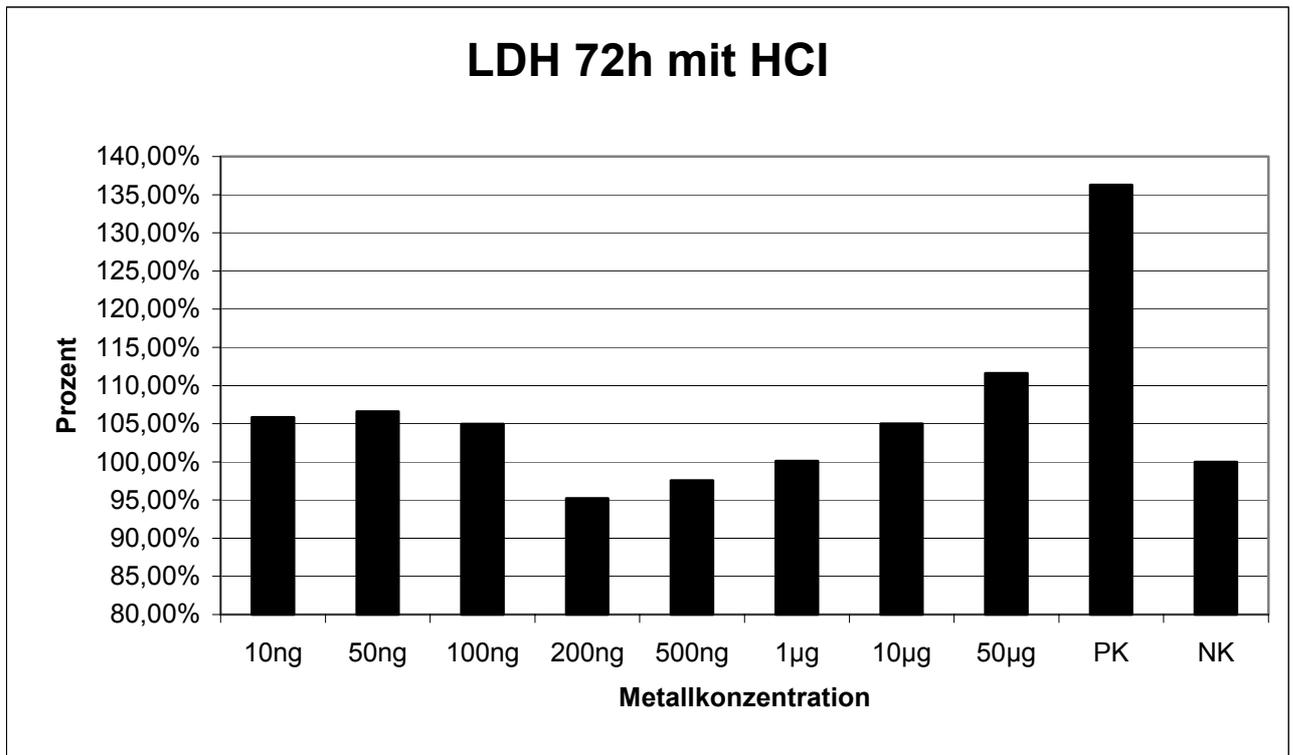


## 3.2 Negativkontrollen

### 3.2.1 Ausschluss der schädigenden Wirkung von HCl

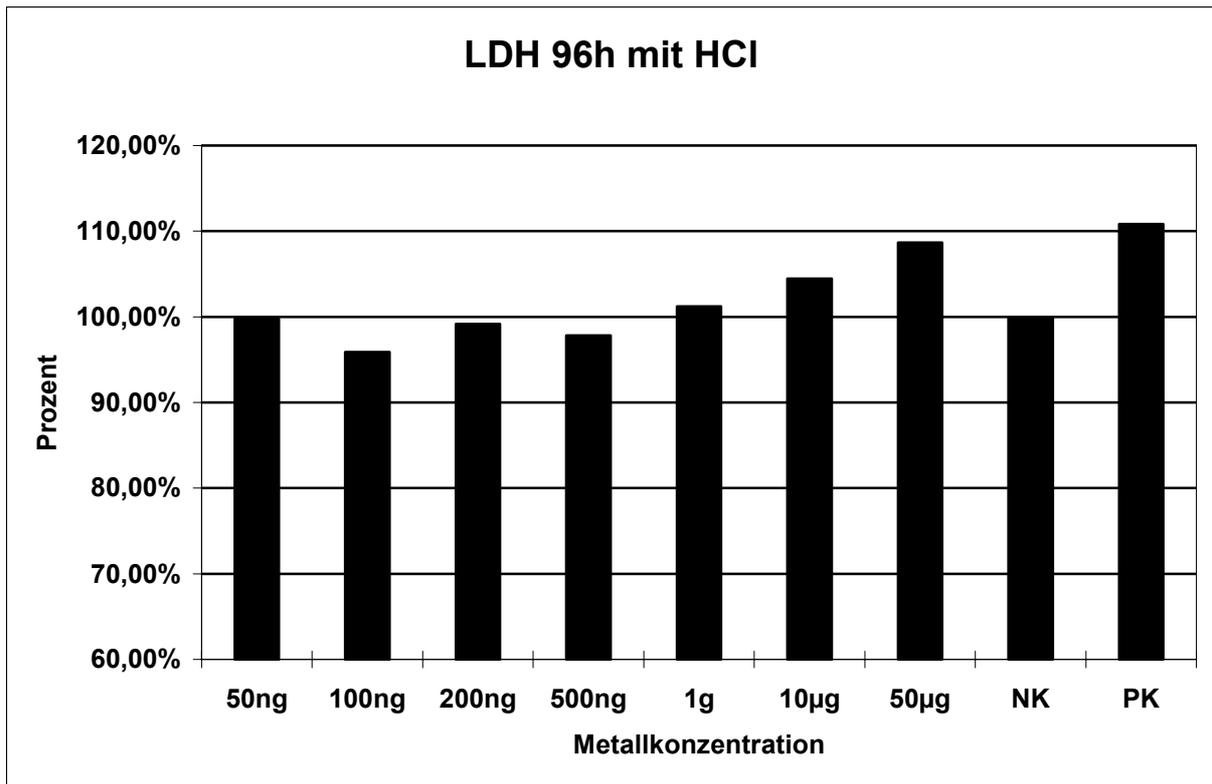
#### 3.2.1.1 LDH-Test mit HCl nach 72h

|                   | 10ng    | 50ng    | 100ng   | 200ng  | 500ng  | 1µg     | 10µg    | 50µg    | PK      | NK      |
|-------------------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1                 | 1,395   | 1,589   | 1,508   | 1,578  | 1,512  | 1,597   | 1,532   | 1,788   | 2,166   | 1,572   |
| 2                 | 1,649   | 1,649   | 1,709   | 1,312  | 1,466  | 1,506   | 1,595   | 1,658   | 1,972   | 1,563   |
| 3                 | 1,794   | 1,634   | 1,581   | 1,462  | 1,481  | 1,473   | 1,673   | 1,655   | 2,091   | 1,525   |
|                   |         |         |         |        |        |         |         |         |         | 1,548   |
|                   |         |         |         |        |        |         |         |         |         | 1,413   |
|                   |         |         |         |        |        |         |         |         |         | 1,521   |
| <b>Mittelwert</b> | 1,613   | 1,624   | 1,599   | 1,451  | 1,486  | 1,525   | 1,600   | 1,700   | 2,076   | 1,524   |
| <b>Prozent</b>    | 105,84% | 106,58% | 104,97% | 95,21% | 97,55% | 100,11% | 105,01% | 111,59% | 136,27% | 100,00% |



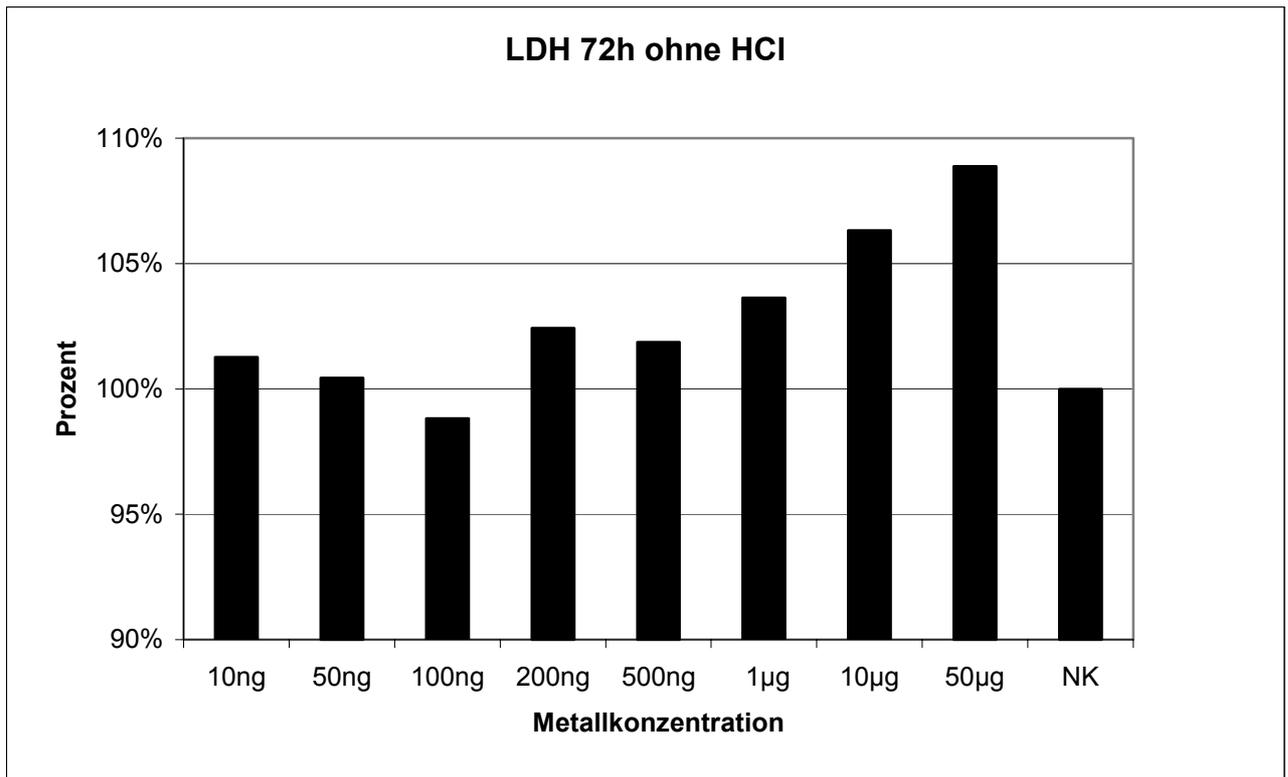
### 3.2.1.2 LDH-Test mit HCl nach 96h

|            | 10ng   | 50ng   | 100ng  | 200ng  | 500ng  | 1g      | 10µg    | 50µg    | NK      | PK      |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <b>1</b>   | 2,011  | 2,192  | 1,988  | 2,166  | 2,13   | 2,188   | 2,23    | 2,275   | 2,131   | 2,321   |
| <b>2</b>   | 1,981  | 2,263  | 2,242  | 2,192  | 2,109  | 2,189   | 2,156   | 2,282   | 1,954   | 2,411   |
| <b>3</b>   | 2,275  | 1,942  | 1,918  | 2,001  | 2,033  | 2,111   | 2,312   | 2,412   | 2,345   | 2,375   |
|            |        |        |        |        |        |         |         |         | 2,152   |         |
|            |        |        |        |        |        |         |         |         | 1,964   |         |
|            |        |        |        |        |        |         |         |         | 2,278   |         |
| Mittelwert | 2,089  | 2,132  | 2,049  | 2,120  | 2,091  | 2,163   | 2,233   | 2,323   | 2,137   | 2,369   |
| Prozent    | 97,74% | 99,77% | 95,88% | 99,17% | 97,82% | 101,22% | 104,46% | 108,69% | 100,00% | 110,84% |
| Stdabw.    | 0,132  | 0,138  | 0,139  | 0,085  | 0,042  | 0,037   | 0,064   | 0,063   | 0,135   | 0,037   |



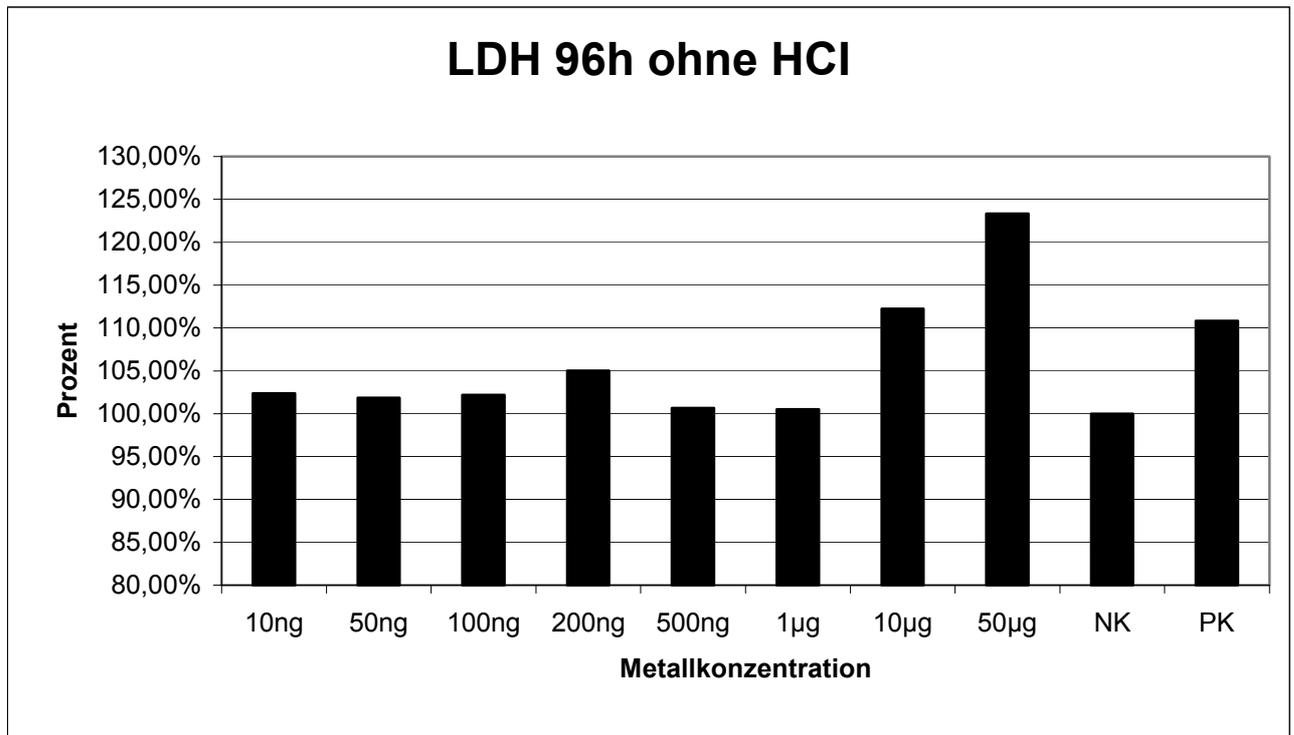
### 3.2.1.3 LDH-Test ohne HCl nach 72h

|                   | 10ng    | 50ng    | 100ng  | 200ng   | 500ng   | 1µg     | 10µg    | 50µg    | NK      | PK      |
|-------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <b>1</b>          | 1,498   | 1,517   | 1,538  | 1,495   | 1,53    | 1,429   | 1,589   | 1,569   |         |         |
| <b>2</b>          | 1,586   | 1,586   | 1,479  | 1,511   | 1,472   | 1,677   | 1,677   | 1,652   |         |         |
| <b>3</b>          | 1,546   | 1,489   | 1,501  | 1,738   | 1,655   | 1,632   | 1,595   | 1,757   |         |         |
| <b>Mittelwert</b> | 1,543   | 1,531   | 1,506  | 1,581   | 1,552   | 1,579   | 1,620   | 1,659   | 1,524   | 2,076   |
| <b>Prozent</b>    | 101,27% | 100,44% | 98,82% | 103,76% | 101,86% | 103,63% | 106,32% | 108,88% | 100,00% | 136,27% |
| <b>Stndabw.</b>   | 0,036   | 0,041   | 0,024  | 0,111   | 0,076   | 0,108   | 0,040   | 0,077   | 0,080   | 0,080   |



### 3.2.1.4 LDH-Test ohne HCl nach 96h

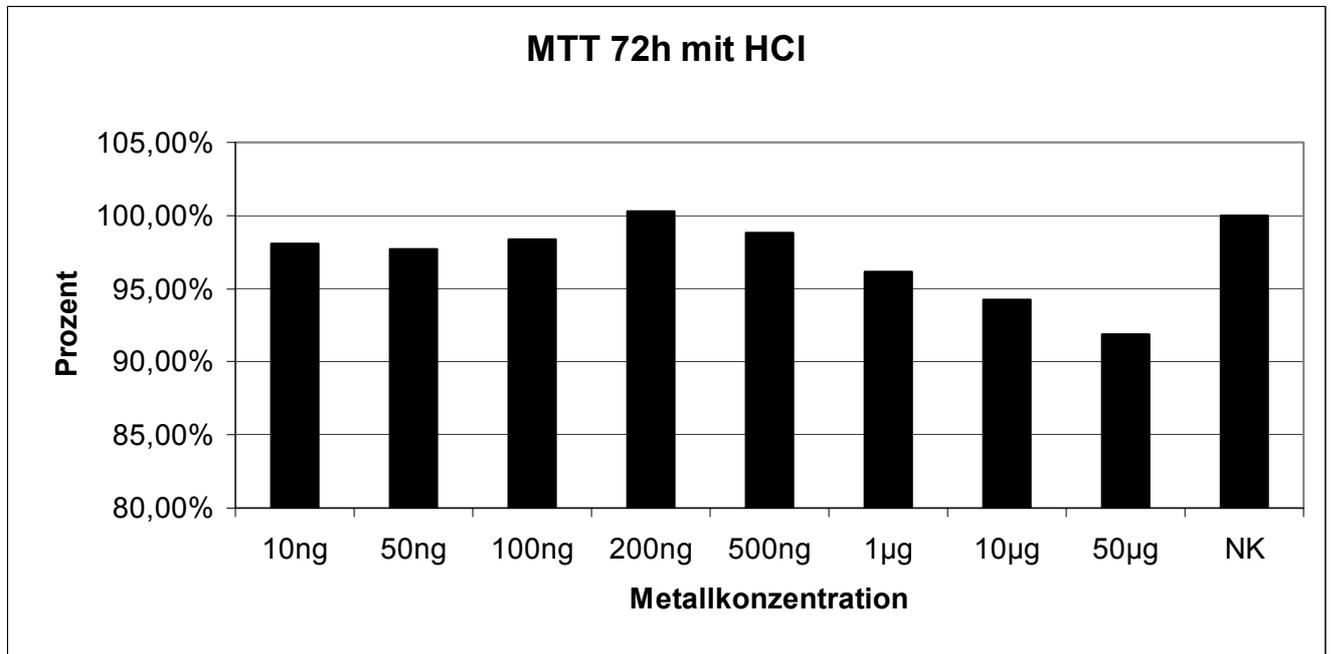
|                   | 10ng           | 50ng           | 100ng          | 200ng          | 500ng          | 1µg            | 10µg           | 50µg           | NK             | PK             |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>1</b>          | 2,211          | 2,271          | 2,713          | 2,388          | 1,933          | 2,281          | 2,516          | 2,931          | 2,012          | 2,321          |
| <b>2</b>          | 2,262          | 2,341          | 2,199          | 2,611          | 2,522          | 2,005          | 2,166          | 2,811          | 2,221          | 2,411          |
| <b>3</b>          | 2,351          | 2,177          | 1,899          | 2,001          | 2,254          | 2,412          | 2,798          | 2,477          | 2,511          | 2,375          |
|                   |                |                |                |                |                |                |                |                | 2,252          |                |
|                   |                |                |                |                |                |                |                |                | 1,922          |                |
|                   |                |                |                |                |                |                |                |                | 2,411          |                |
| <b>Mittelwert</b> | 2,275          | 2,263          | 2,270          | 2,333          | 2,236          | 2,233          | 2,493          | 2,740          | 2,222          | 2,369          |
| <b>Prozent</b>    | <b>102,39%</b> | <b>101,87%</b> | <b>102,20%</b> | <b>105,03%</b> | <b>100,67%</b> | <b>100,50%</b> | <b>112,24%</b> | <b>123,33%</b> | <b>100,00%</b> | <b>110,84%</b> |
| <b>Stndabw.</b>   | 0,058          | 0,067          | 0,336          | 0,252          | 0,241          | 0,170          | 0,259          | 0,192          | 0,206          | 0,037          |



### 3.2.1.5 MTT-Test mit HCl nach 72h

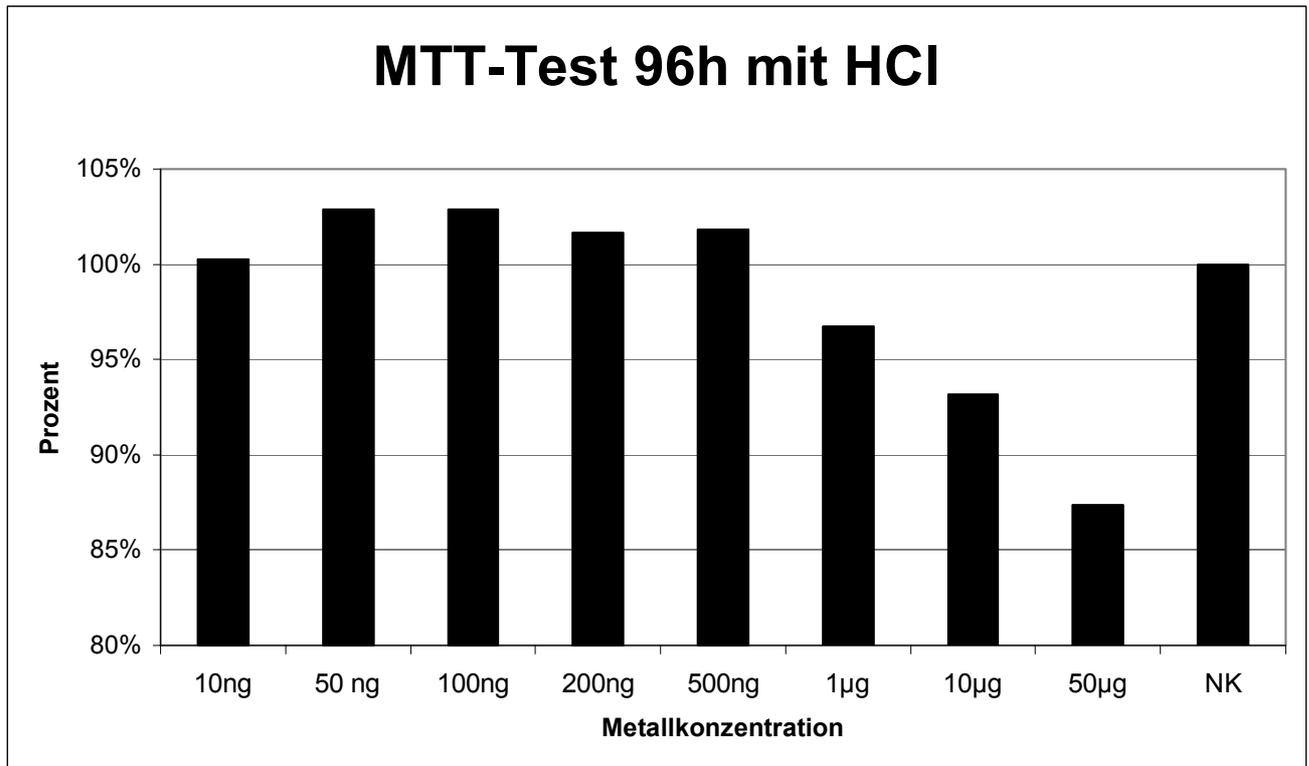
|                   | <b>10ng</b>   | <b>50ng</b>   | <b>100ng</b>  | <b>200ng</b>   | <b>500ng</b>  | <b>1µg</b>    | <b>10µg</b>   | <b>50µg</b>   | <b>NK</b>      |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>1</b>          | 0,571         | 0,571         | 0,566         | 0,593          | 0,572         | 0,549         | 0,539         | 0,532         | 0,549          |
| <b>2</b>          | 0,569         | 0,569         | 0,561         | 0,572          | 0,567         | 0,538         | 0,531         | 0,543         | 0,566          |
| <b>3</b>          | 0,564         | 0,558         | 0,582         | 0,577          | 0,578         | 0,583         | 0,567         | 0,521         | 0,58           |
|                   |               |               |               |                |               |               |               |               | 0,612          |
|                   |               |               |               |                |               |               |               |               | 0,569          |
|                   |               |               |               |                |               |               |               |               | 0,599          |
| <b>Mittelwert</b> | 0,568         | 0,566         | 0,570         | 0,581          | 0,572         | 0,557         | 0,546         | 0,532         | <b>0,579</b>   |
| <b>Prozent</b>    | <b>98,07%</b> | <b>97,73%</b> | <b>98,36%</b> | <b>100,26%</b> | <b>98,82%</b> | <b>96,12%</b> | <b>94,22%</b> | <b>91,86%</b> | <b>100,00%</b> |

Std.abw. 0,003 0,006 0,009 0,009 0,004 0,019 0,015 0,009 0,021



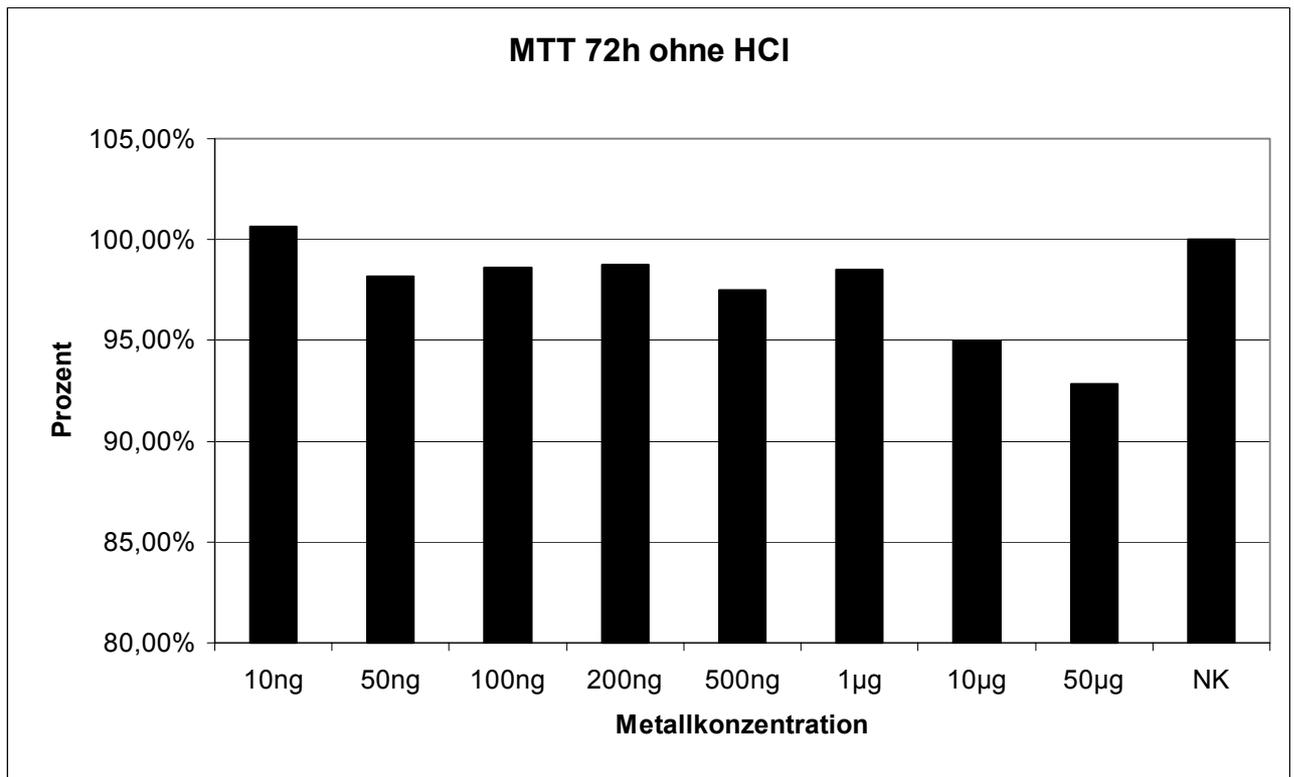
### 3.2.1.6 MTT-Test mit HCl nach 96h

|                   | 10ng           | 50 ng          | 100ng          | 200ng          | 500ng          | 1µg           | 10µg          | 50µg          | NK             |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>1,000</b>      | 0,392          | 0,408          | 0,422          | 0,414          | 0,430          | 0,381         | 0,384         | 0,388         | 0,453          |
| <b>2,000</b>      | 0,421          | 0,395          | 0,455          | 0,412          | 0,416          | 0,417         | 0,381         | 0,324         | 0,422          |
| <b>3,000</b>      | 0,416          | 0,433          | 0,386          | 0,420          | 0,402          | 0,388         | 0,377         | 0,359         | 0,421          |
|                   |                |                |                |                |                |               |               |               | 0,363          |
|                   |                |                |                |                |                |               |               |               | 0,432          |
|                   |                |                |                |                |                |               |               |               | 0,361          |
| <b>Mittelwert</b> | 0,410          | 0,421          | 0,421          | 0,415          | 0,416          | 0,395         | 0,381         | 0,357         | 0,409          |
| <b>Prozent</b>    | <b>100,24%</b> | <b>102,90%</b> | <b>102,90%</b> | <b>101,63%</b> | <b>101,79%</b> | <b>96,74%</b> | <b>93,15%</b> | <b>87,36%</b> | <b>100,00%</b> |
| Stdabw.           | 0,013          | 0,012          | 0,035          | 0,003          | 0,011          | 0,016         | 0,003         | 0,026         | 0,035          |



#### 3.2.1.7 MTT-Test ohne HCl nach 72h

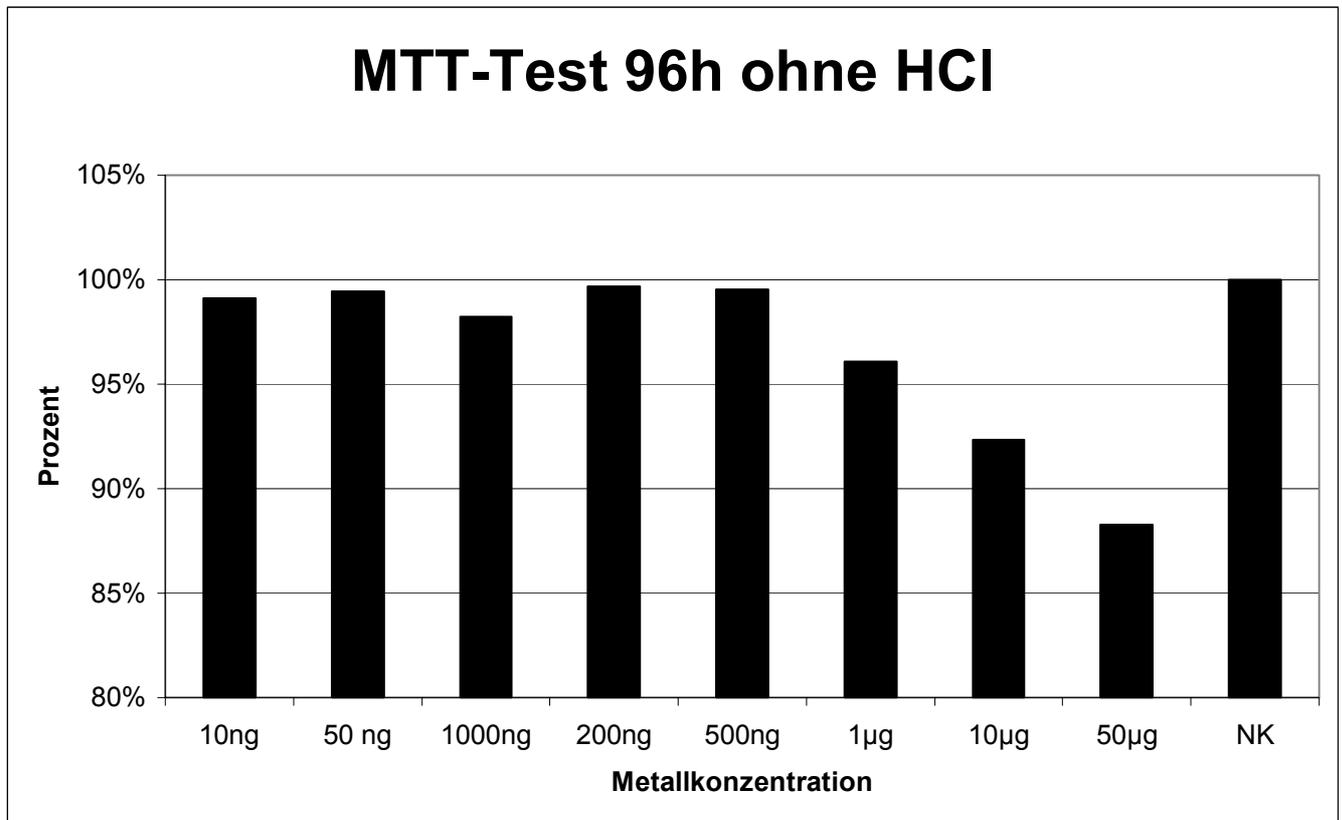
|                   | 10ng           | 50ng          | 100ng         | 200ng         | 500ng         | 1µg           | 10µg          | 50µg          | NK             |
|-------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>1</b>          | 0,599          | 0,571         | 0,567         | 0,597         | 0,591         | 0,586         | 0,549         | 0,542         |                |
| <b>2</b>          | 0,573          | 0,561         | 0,552         | 0,556         | 0,541         | 0,549         | 0,555         | 0,534         |                |
| <b>3</b>          | 0,576          | 0,573         | 0,594         | 0,562         | 0,561         | 0,576         | 0,546         | 0,537         |                |
| <b>Mittelwert</b> | 0,583          | 0,568         | 0,571         | 0,572         | 0,564         | 0,570         | 0,550         | 0,538         | 0,579          |
| <b>Prozent</b>    | <b>100,63%</b> | <b>98,16%</b> | <b>98,62%</b> | <b>98,73%</b> | <b>97,47%</b> | <b>98,50%</b> | <b>94,99%</b> | <b>92,86%</b> | <b>100,00%</b> |
| <b>Stdabw.</b>    | 0,012          | 0,005         | 0,017         | 0,018         | 0,021         | 0,016         | 0,004         | 0,003         |                |



### 3.2.1.8 MTT-Test ohne HCl nach 96h

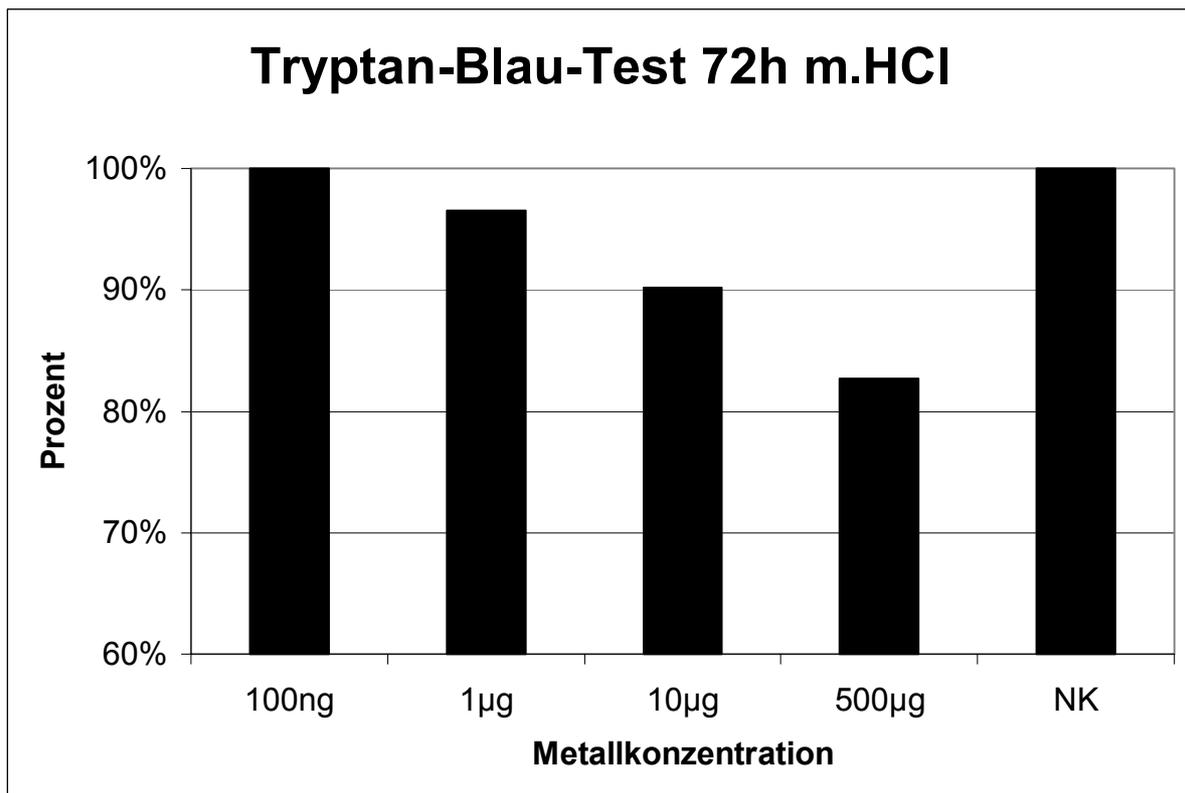
|                    | 10ng          | 50 ng         | 1000ng        | 200ng         | 500ng         | 1µg           | 10µg          | 50µg          | NK             |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>1,000</b>       | 0,417         | 0,389         | 0,418         | 0,405         | 0,432         | 0,366         | 0,368         | 0,393         | 0,453          |
| <b>2,000</b>       | 0,389         | 0,402         | 0,385         | 0,395         | 0,423         | 0,426         | 0,377         | 0,420         | 0,422          |
| <b>3,000</b>       | 0,409         | 0,428         | 0,418         | 0,422         | 0,365         | 0,386         | 0,387         | 0,269         | 0,421          |
|                    |               |               |               |               |               |               |               |               | 0,363          |
|                    |               |               |               |               |               |               |               |               | 0,432          |
|                    |               |               |               |               |               |               |               |               | 0,361          |
| <b>Mittelwert:</b> | 0,405         | 0,406         | 0,402         | 0,407         | 0,407         | 0,393         | 0,377         | 0,361         | 0,409          |
| <b>Prozent</b>     | <b>99,10%</b> | <b>99,43%</b> | <b>98,25%</b> | <b>99,67%</b> | <b>99,51%</b> | <b>96,08%</b> | <b>92,33%</b> | <b>88,25%</b> | <b>100,00%</b> |

Stndabw. 0,012 0,016 0,017 0,011 0,030 0,025 0,008 0,066



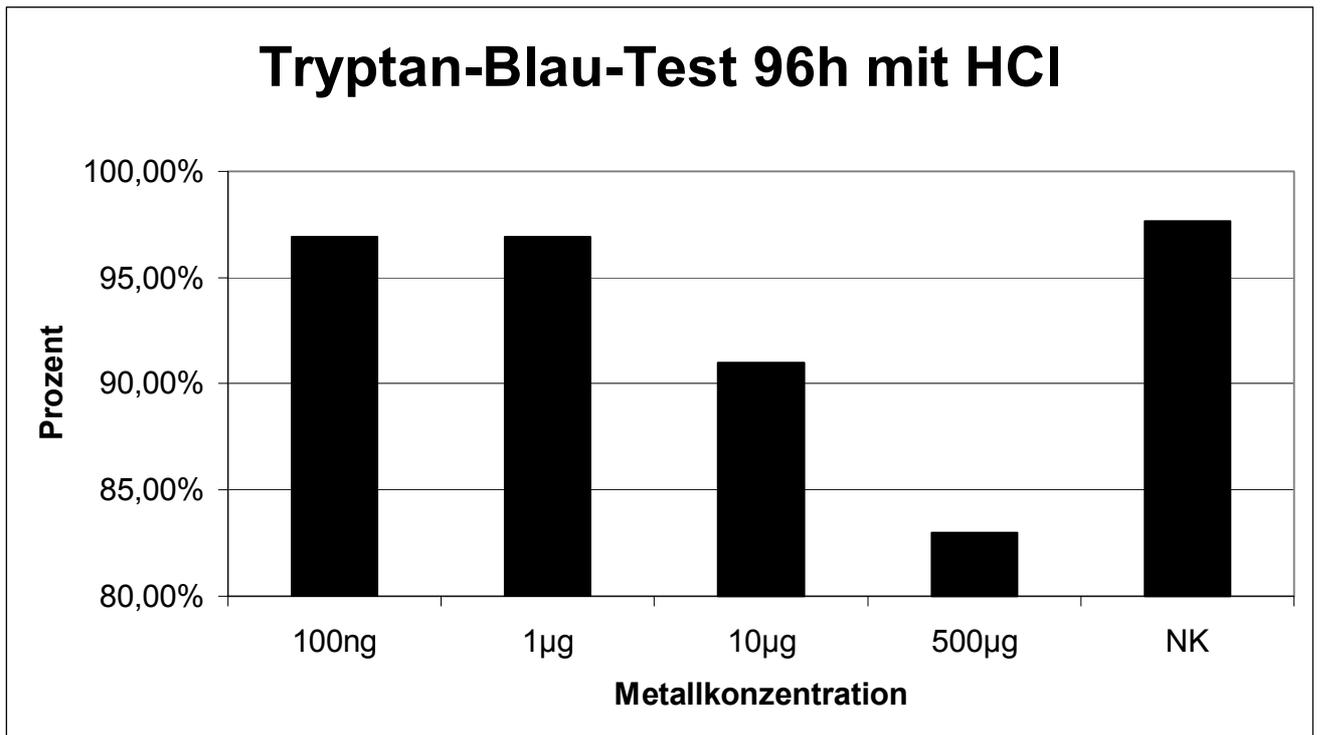
### 3.2.1.9 Tryptan-Blau-Test mit HCl nach 72h

|              | leb. Zellen | tote Zellen | gesamt | Prozent        |
|--------------|-------------|-------------|--------|----------------|
| <b>100ng</b> | 207500      | 0           | 207500 | <b>100%</b>    |
| <b>1µg</b>   | 173750      | 6250        | 180000 | <b>96,53%</b>  |
| <b>10µg</b>  | 218750      | 23750       | 242500 | <b>90,21%</b>  |
| <b>500µg</b> | 167500      | 35000       | 202500 | <b>82,72%</b>  |
| <b>NK</b>    | 141250      | 0           | 141250 | <b>100,00%</b> |



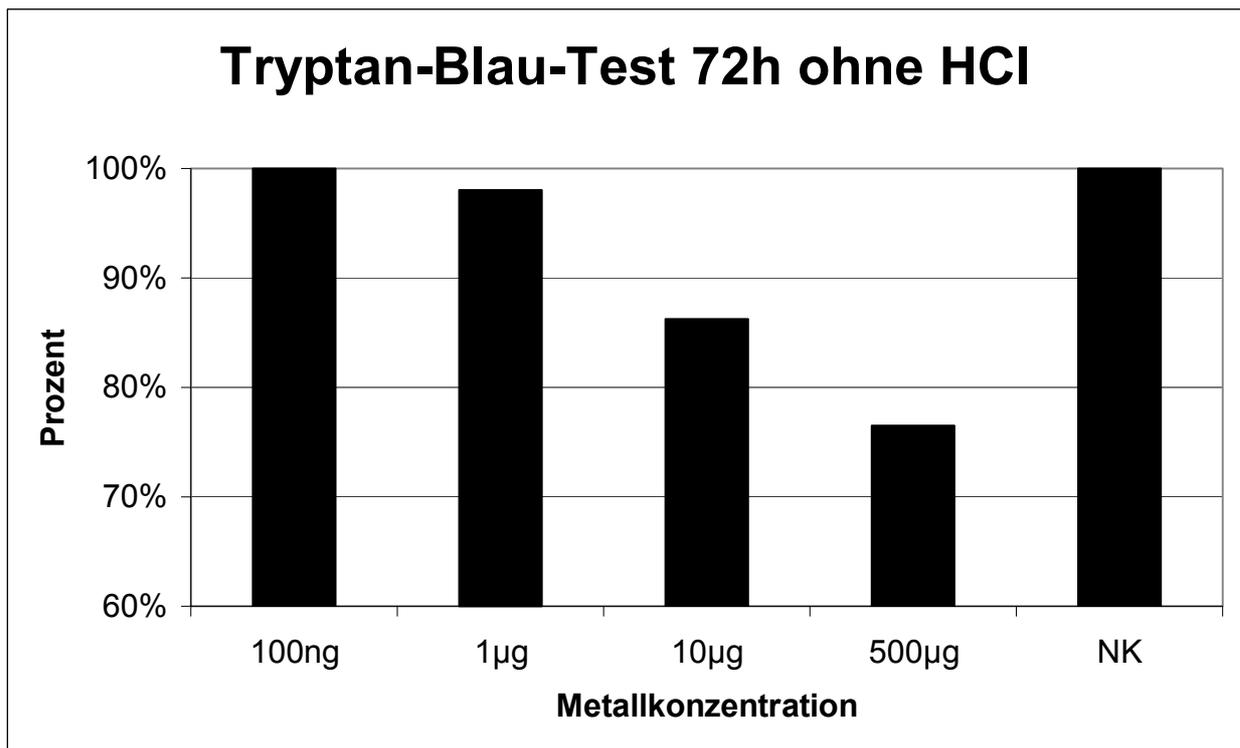
#### 3.2.1.10 Tryptan-Blau-Test mit HCl nach 96h

|              | leb. Zellen | tote Zellen | gesamt | Prozent       |
|--------------|-------------|-------------|--------|---------------|
| <b>100ng</b> | 236250      | 7500        | 243750 | <b>96,92%</b> |
| <b>1µg</b>   | 237500      | 7500        | 245000 | <b>96,93%</b> |
| <b>10µg</b>  | 252500      | 25000       | 277500 | <b>90,99%</b> |
| <b>500µg</b> | 195000      | 40000       | 235000 | <b>82,97%</b> |
| <b>NK</b>    | 208750      | 5000        | 213750 | <b>97,66%</b> |



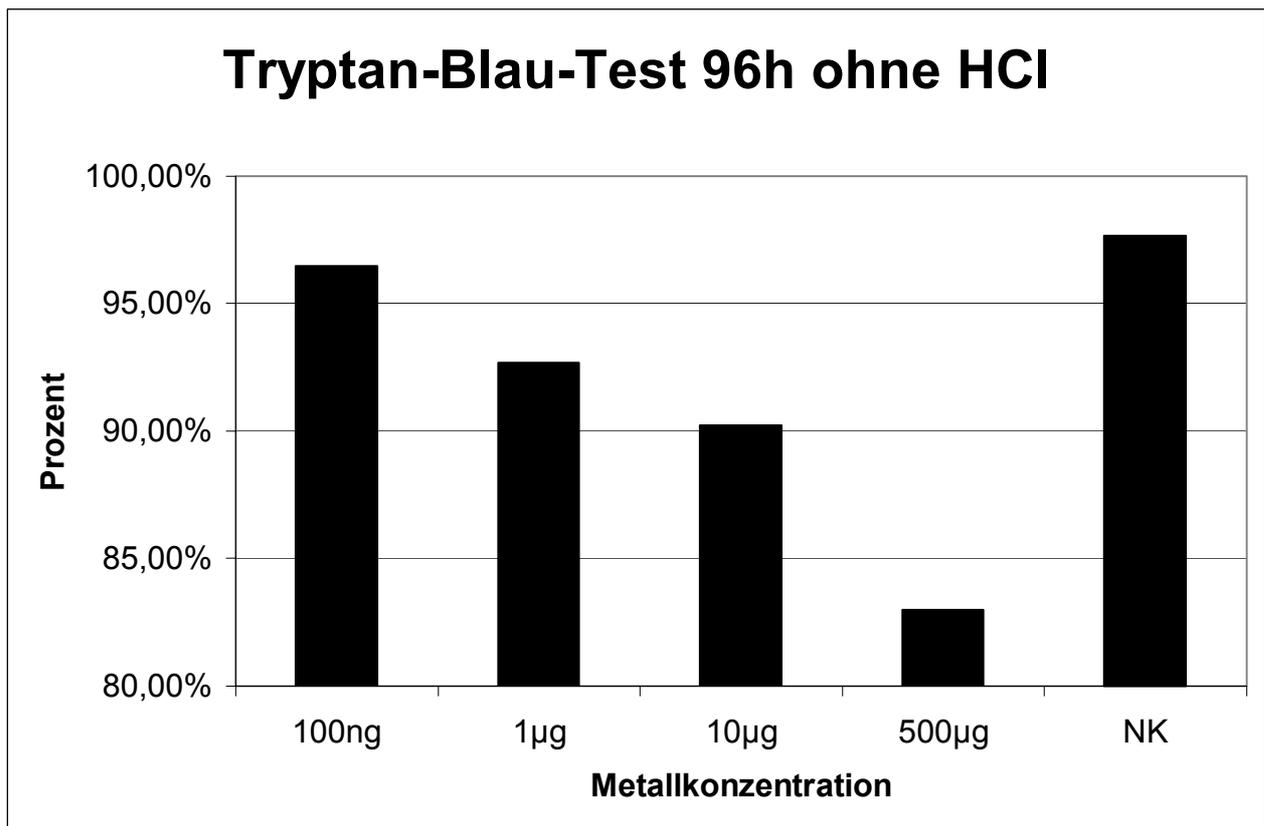
#### 3.2.1.11 Tryptan-Blau-Test ohne HCl nach 72h

|              | leb. Zellen | tote Zellen | gesamt | Prozent       |
|--------------|-------------|-------------|--------|---------------|
| <b>100ng</b> | 176250      | 0           | 176250 | <b>100%</b>   |
| <b>1µg</b>   | 188750      | 3750        | 192500 | <b>98,05%</b> |
| <b>10µg</b>  | 148750      | 23750       | 172500 | <b>86,23%</b> |
| <b>500µg</b> | 158750      | 48750       | 207500 | <b>76,51%</b> |
| <b>NK</b>    | 141250      | 0           | 141250 | <b>100%</b>   |



#### 3.2.1.12 Tryptan-Blau-Test ohne HCl nach 96h

|              | leb. Zellen | tote Zellen | gesamt | Prozent       |
|--------------|-------------|-------------|--------|---------------|
| <b>100ng</b> | 273750      | 10000       | 283750 | <b>96,48%</b> |
| <b>1µg</b>   | 221250      | 17500       | 238750 | <b>92,67%</b> |
| <b>10µg</b>  | 207500      | 22500       | 230000 | <b>90,22%</b> |
| <b>500µg</b> | 243750      | 50000       | 293750 | <b>82,98%</b> |
| <b>NK</b>    | 208750      | 5000        | 213750 | <b>97,66%</b> |



#### 3.2.1.2 Problem des Materialverlustes

Dadurch, dass der industriell hergestellte Metallstaub zweimal gewogen wurde, einmal vor und einmal nach der Behandlung mit HCl (2.2.6 und 2.5.2.2.3.6), fiel der teilweise immense Materialverlust auf.

Beispiel:

Es wurden insgesamt 6 2ml-Reaktionsgefäße mit je 25 mg Metallstaub abgewogen. Vier wurden mit HCl gekocht, gewaschen und autoklaviert, zwei nur gewaschen und autoklaviert, hatten also keinen Kontakt zur Salzsäure:

| mHCl            | 1.Wiegen | 2.Wiegen | Differenz in g | Differenz in% |
|-----------------|----------|----------|----------------|---------------|
| 1.              | 25mg     | 11,00mg  | 14,00mg        | <b>56,00%</b> |
| 2.              | 25mg     | 9,63mg   | 15,37mg        | <b>61,48%</b> |
| 3.              | 25mg     | 7,43mg   | 17,57mg        | <b>70,28%</b> |
| 4.              | 25mg     | 8,24mg   | 16,76mg        | <b>67,04%</b> |
| <b>ohne HCl</b> |          |          |                |               |
| 1.              | 25mg     | 15,8mg   | 9,2mg          | <b>36,80%</b> |
| 2.              | 25mg     | 17,25mg  | 7,75mg         | <b>31,00%</b> |

Es wird hier deutlich, dass bis zu 70% von HCl-exponiertem und bis zu 36% des nicht HCl-exponierten Metallstaubes im Laufe der Behandlung verloren gehen.

### 3.2.2 Negativkontrolle mit Nativgewebe

Nach den 5 Waschgängen waren lichtmikroskopisch gesehen keine Rückstände mehr zu sehen. In den 2ml-Reaktionsgefäßen befand sich eine klar anzusehende Flüssigkeit.

### 3.3 Metallkonzentration im Patientengewebe

|               | Interface             | Neokapsel             |
|---------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Probe1</b> | 3,0+/-0,4µg/l         | 1,0+/-0,1µg/l         |
| <b>Probe2</b> | 163,2+/-20,9µg/l 1:10 | 142,9+/-29,8µg/l 1:10 |
| <b>Probe3</b> | 37,2+/-52,8µg/l 1:10  |                       |

Die Interface-Proben Nr. 2 und 3 sowie die Neokapsel-Probe Nr.2 mussten 1:10 verdünnt werden, da die Konzentrationen zu gross waren und durch das Messgerät somit nicht mehr erfasst werden konnten.

Um nun die vorhandene Metallmenge zu berechnen, geht man folgendermassen vor:  
 Von Probe 1 und 2 waren jeweils 20 ml vorhanden, von Probe2 nur 10 ml.  
 Multipliziert man nun die verdünnten Proben wieder mit dem Faktor 10 und berechnet, addiert die Konzentrationen, so erhält man eine Konzentration von 3437µg/l.  
 Bei einer Probenmenge von insgesamt 50ml macht das eine Metallmenge von 171,85µg.

### 4. Diskussion

Die Isolierung der Cobalt-Chrom Partikel weist wie im Ergebnisteil sichtbar noch einige Schwächen auf. Mit nur drei für die Arbeit in Frage kommenden Patientinnen war sehr geringes Material vorhanden. Eine Konzentration von 171,85 µg bei insgesamt nur 3 Proben erschwert ein Arbeiten mit diesen Partikeln. Um mit den Metallpartikeln weiterarbeiten zu können, muss man Lochplatten mit wenigstens 10 bzw. 50µg pro Loch beschicken. Dafür müsste man jedoch mehr Material auflösen.

Erstaunlich sind auch die völlig unterschiedlichen Konzentrationen an Cobalt, die im Gewebe der Patienten im Vergleich zu finden waren. Inwieweit dies jedoch mit individuellen Unterschieden zu tun hat, oder einfach die falsche Gewebestelle aufgelöst wurde, bleibt

fraglich. Der Vergleich der Cobalt-Chrom Konzentrationen mit anderen Studien ist schwierig bis unmöglich, da unterschiedliche Masseinheiten verwendet wurden, bzw. die Konzentrationen ungenannt blieben (7,10).

Ein zweiter Grund für die geringen bzw. unterschiedlichen Konzentrationen könnte Materialverlust während der Arbeitsschritte sein. Bei den Negativkontrollen mit industriell hergestelltem Metallstaub wurde dies näher untersucht. Materialverluste von bis zu 70 % wurden festgestellt. Gründe für den Verlust sind wohl die Verwendung von Glasgefäßen während des Kochens. Bei Glas besteht eine besonders hohe Oberflächenhaftung (15), sodass während des Umfüllens in die aus Plastik bestehenden 2ml-Reaktionsgefäße ein Anteil des Metalls nicht übertragen wird.

Ein weiterer Grund ist das häufige Waschen, bei dem fünfmal der Überstand abpipettiert werden muss und so die Wahrscheinlichkeit enorm steigt, dass durch fehlerhaftes pipettieren das Pellet berührt wird und Teile davon mit abpipettiert werden.

Die Effektivität der Gewebeauflösung mit Salzsäure wurde in Punkt 2.5.2.1.1 genauer untersucht. Da mikroskopisch keine Geweberückstände mehr sichtbar sind, steigert diese Tatsache die Effizienz dieser Methode. In den Reaktionsgefäßen mit aufgelöstem Patientenmaterial war stets ein dunkles Pellet übriggeblieben. Es liegt also nahe zu vermuten, dass es sich bei dem dunklen Pellet um Metallrückstände handelt, da diese den einzigen Unterschied zum Nativmaterial ausmachen.

Dies weist darauf hin, dass Salzsäure Metall nicht angreift bzw. auflöst, und ausserdem Metallspuren weder abzentrifugiert noch nicht isoliert werden.

Im vorangegangenen Teil wurde deutlich, dass der Hauptaufwand bei der Findung einer neuen Methode zur Isolierung von Metallpartikeln aus Gewebe um Endoprothesen deren Etablierung bzw. den Negativkontrollen zukam.

Die Verwendung von Salzsäure zur Auflösung des Gewebes stellt in der Literatur eine Neuheit dar. Den einzig mögliche Vergleich liefern Arbeiten, bei denen ebenfalls mit säurehaltigen Agentien wie Ameisensäure und Salpetersäure (1, 9) gearbeitet wurde. In beiden Publikationen wurde jedoch nicht mit den Partikeln weitergearbeitet bzw. deren mögliche Veränderung durch die Säuren erforscht.

Wie in den Diagrammen des MTT-, LDH- und Tryptan-Blau-Testes ersichtlich, ergibt sich kein relevanter Unterschied bei den Ergebnissen der metall und nicht metal-exponierten Platten:

Bei den Ergebnissen des LDH-Testes liegt die Aktivität des Enzyms mit HCl-exponiertem Metall nach 72 und 96h bei 136 und 110%, mit nicht-HCL-exponierten Metall nach 72 und 96h bei 108 und 123 %.

Bei den Ergebnissen des MTT-Testes liegt die Aktivität des Enzyms mit HCl-exponiertem Metall nach 72 und 96h bei 91 und 87 %, mit nicht-HCL-exponierten Metall nach 72 und 96h bei 92 und 88 %.

Bei den Ergebnissen des Tryptan-Blau-Testes fällt die Zellkonzentration mit HCl-exponierten Metall nach 72 und 96 h auf 83 und 82 mit nicht-HCl-exponiertem Metall nach 72 und 96h auf 76 und 83 %.

Die Ergebnisse des MTT-Testes sind also fast identisch. Die Differenzen, die bei dem LDH-Test sichtbar sind haben eher nichts mit HCl zu tun, läge sonst die Enzymaktivität der Lactatdehydrogenase bei nicht behandeltem Metallstaub höher? Wahrscheinlicher sind Messfehler oder Pipettierfehler.

Der Tryptan-Blau-Test veranlasst ebenfalls nicht dazu, eine die Messung beeinflussende Wirkung von HCl zu vermuten.

Was in den Diagrammen des MTT- und LDH-Testes durchgängig zu beobachten war, ist die Tatsache, dass Enzymaktivitäten erst ab einer Metallstaubmenge von 1 µg zu differieren beginnen. Die Konzentrationen von 10ng bis 500 ng variieren immer um die 100 %-Marke, ohne dass sich eine sinnvolle Aussage darüber machen lässt. Ein vorzeitiges „Ansteigen“ der

LDH bei 10 ng ist eher ein Ausreisser. Auch in der Literatur wurde bereits berichtet, dass Konzentrationen, die im Nanogramm pro Mililiter- Bereich liegen, keine Veränderungen des Zellwachstums und der Viabilität verursachen(18)

Es gibt mehrere Gründe dafür, dass die Enzymaktivität erst ab einer Cobalt-Chrom-Konzentration von 1 µg pro µl beginnt:

Erstens könnte es ein Beweis dafür sein, dass Metallabrieb erst ab einer grösseren Konzentration eine schädigende Wirkung hat. Es könnte aber auch sein, dass Fehler bei der Verdünnungsreihe aufgetreten sind, sodass eine kleinere Konzentration wie hier im ng-Bereich gar nicht zu erreichen ist, also gar kein Metall enthalten war. Im Mikroskop waren keine Partikel mehr zu erkennen, was jedoch nicht eindeutig zu bewerten ist.

Im Diagramm ist ersichtlich, dass der LDH-test bereits nach 72h eine sehr hohe Aktivität zeigt und dann wieder rückläufig ist.

Der MTT-Test zeigt erst nach 96h seine höchsten Ergebnisse.

Das könnte bedeuten, dass die Zellmembran zuerst kaputt geht, die metabolische Aktivität jedoch erst später eingestellt wird.

Anhand der Ergebnisse sieht man, dass diese Methode zur Isolierung von Metallabrieb eine neue Möglichkeit ist, mit Patientenmaterial zu arbeiten und somit die in vivo Verhältnisse bei Prothesenlockerungen besser zu verstehen bzw. zu erforschen.

Dass Cobalt-Chrom-Staub ab einer bestimmten Konzentration Zellen schädigt, konnte hier ein weiteres Mal bestätigt werden, auch wenn diese Versuche durch die Verwendung mit industriell hergestellten Metall-Partikeln durchgeführt wurden.

Es ist sicherlich sinnvoll diese Versuche weiterzuführen, um dann in weiteren Arbeiten isolierte Metallpartikel mit Zellen zu inkubieren, und so weiter die schädigende Wirkung von Metallabrieb bei totalen Endoprothesen anhand diverser Tests zu untersuchen und vielleicht sogar in einem weiteren Schritt Abwehrmechanismen zu etablieren..

## **5. Zusammenfassung**

Als Ursache der aseptischen Lockerung von Totalendoprothesen wird in der Literatur unter anderem der Metallabrieb genannt, der über eine immunologische Antwort zu Osteolysen führt. Da bei diesen Versuchen meist mit industriell hergestellten Metallpartikeln gearbeitet wird, wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die ermöglichen soll, Metallabrieb von Totalendoprothesen aus Patientengewebe zu isolieren.

Bei Revisionen von aseptisch gelockerten Cobalt-Chrom-Endoprothesen mit radiologisch gesicherten Osteolysezeichen wurde intraoperativ Neokapsel- und Interfacegewebe gewonnen. Ausserdem wurde eine Gewebeprobe zur Negativkontrolle aus Knochen und Gelenkkapsel vor einem Protheseneinbau entnommen. In der Literatur wurde schon mit

unterschiedlichen Säuren gearbeitet. Dadurch entstand die Idee Salzsäure zu verwenden, da dazu bisher keine Arbeiten vorhanden sind.

Zunächst wurde das Gewebe in 0.5cm große Stücke zerkleinert, um es anschließend in Salzsäure zu erhitzen. In verschiedenen Versuchen wurden die Säurekonzentration (5%, 10%), die Temperatur (100°C, 200°C) und die Dauer der Wärmezufuhr (1-3h) variiert, um die effektivste Methode herauszufinden. Anschließend wurden durch 5 aufeinanderfolgende Waschgänge, bei denen nach Zentrifugation der Überstand abpipettiert und die Reaktionsgefäße mit destilliertem Wasser wieder aufgefüllt werden, die restlichen Rückstände der Salzsäure entfernt um etwaige Komplikationen in der Zellkultur auszuschliessen. Der quantitative Nachweis der Partikelkonzentration erfolgte mittels der Atomabsorptionsspektrophotometrie.

Um ausschliessen zu können, dass die Salzsäure das Metall verändert und in weiteren Versuchen falsche Ergebnisse liefern würde, wurden Negativkontrollen durchgeführt. So wurde industriell hergestellter Cobalt-Chrom Staub ebenfalls zwei Stunden in Salzsäure gekocht, gewaschen, auf humane Osteosarkomzellen gegeben und inkubiert. Nach 72h und 96h wurden LDH-, MTT- und Tryptan-blau Tests durchgeführt um die Viabilität der Zellen zu überprüfen. Parallel dazu wurden die gleichen Tests auch mit unbehandeltem Cobalt-Chrom-Staub durchgeführt. Die Ergebnisse der Tests mit säure-exponiertem und nicht säureexponiertem Metallstaub differierten nicht wesentlich. So liegt die Aktivität der LDH bei HCL-exponiertem Staub nach 72h und 96h bei 136% und 110%, mit nicht HCL-exponiertem Staub bei 108 % und 123%. Bei den Ergebnissen des MTT-Testes liegt die Aktivität des Enzyms mit HCL-exponiertem Metall nach 72 und 96h bei 91% und 87 %, mit nicht-HCL-exponiertem Metall nach 72 und 96h bei 92% und 88 %.

Bei den Ergebnissen des Tryptan-Blau-Testes fällt die Zellkonzentration mit HCL-exponiertem Metall nach 72 und 96 h auf 83% und 82% mit nicht-HCL-exponiertem Metall nach 72 und 96h auf 76% und 83 %.

In einer zweiten Negativkontrolle wurde das Gewebe, das vor einem Protheseneinbau gewonnen worden war, aufgelöst und gewaschen. Es konnte im Gegensatz zu dem beim Prothesenwechsel gewonnenen Material im Lichtmikroskop kein Metallstaub nachgewiesen werden.

Die durch die Atomabsorptionsspektroskopie ermittelten Konzentration betragen in der Neokapsel bis zu 39 µg/l, im Interfacegewebe bis zu 2,5 mg/l. Die Nachweisgrenze für Konzentrationsmessungen mit der Atomabsorptionsspektrophotometrie liegt bei 1µg/l. Durch die geringe Cobalt-Chrom-Konzentration die aus dem Patientengewebe gewonnen werden konnte, war es nicht möglich weitere Tests mit diesem Material durchzuführen.

## 6. Literaturliste

1. Blumenthal, N.C., Cosma, V., Jaffe, W., Stuchin, S.

A new technique for quantitation of metal particulates and metal reaction products in tissue near implants

Journal of applied biomaterials, Vol 5, 191-93 (1994)

2. Budde La, J.K., Orosz, J.F., Bonfiglio, T.A., Pellegrini, V.D.Jr.  
 Particulate titanium and cobalt-chrome metallic debris in failed total knee arthroplasty.  
 A quantative histologic analysis  
 Journal of Arthroplasty, 1994, June;9(3):291-304
  
3. Chiba, J., Rubash, H., Kim,K., Iwaki, Y.  
 The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed  
 cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis  
 Clinical orthopaedics, Vol. 300, 304-312, 1994
  
4. Ferrier, G., McEvoy, A., Evans, C., Andrew, J.  
 The effect of cyclic pressure on human monocyte-derived macrophages in vitro  
 Journal of bone and joint surgery (Br), Vol 82-B, 755-759, 2000
  
5. Glant, T., Valyon, M., Mikecs, K., Cole, A., Jacobs, J., Yao, J., Kuettner, K.  
 Discoordinate expression of IL-1a and IL-1b in interfacial membranes of of failed  
 joint prostheses  
 Agents action Vol 41, C172-173, 1994
  
6. Glant, T., Valyon, M., Mikecs, K., Yao, L., Chubinskaja, S., Williams, J., Urban, L.,  
 Shanbhag, A., Lee, S., Sumner, D.  
 Particulate-induced prostaglandin- and cytokine-mediated bone resorption in an  
 experimental system and in failed joint replacements  
 American Journal of Ther., Vol. 3, 27-41, 1996
  
7. Hirakawa, K., Bauer, T., Stulberg, B., Wilde, A., Secic, M.  
 Characterization and comparison of wear debris from failed total hip implants of  
 different types  
 Journal of bone and joint surgery, Vol 78-A, No.8, 1235-1243, 1996

8. Howie, D.W., Rogers, S.D, Mc Gee, M.A., Haynes, D.R.  
Biologic effects of cobalt-chrome in cell and animal bodies  
Clinical Orthopaedics, 1996, August; (329 Suppl.): 217-32
  
9. Margevicius, K., Bauer, T., Mc Mahon, J., Brown, S., Merrit, K.  
Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses  
Journal of bone and joint surgery, Vol 76-A, No.11, 1664-1675, 1994
  
10. Manlapaz, M., Maloney, W., Smith, R.  
In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris  
Journal of orthopaedic research, Vol 14, No.3, 1996
  
11. Murray, D., Rushton, N.  
Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles  
Journal of bone and joint surgery (Br), Vol. 72-B, 988-992, 1990
  
12. Prabhu, A., Shelburne, C., Gibbons, D.  
Cellular proliferation and cytokine response of murine macrophage cell line J774A.1  
to polymethylmethacrylate and cobalt-chrome alloy particles  
Journal of biomedical materials research, Vol 42 (1), 20-29, 1998
  
13. Salvati, E.A, Betts, F., Doty, S.B.  
Particulate metallic debris in cemented total hip arthroplasty  
Clinical Orthopaedics, 1998, Jule; (352): 223-30
  
14. Shanbag, A.S., Jacobs, J.J., Glant, T.T., Gilbert, J.L., Black, J., Galante, J.O.  
Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip

replacement

Journal of Bone and Joint Surgery BR, 1994, January; 76(1):60-7

15. Stemberger, Prof. : Persönliche Mitteilung (2001)

16. Sun, Z., Wataha, J., Hanks, C.

Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation

Journal of biomedical materials research, Vol.34, 29-37, 1997

17. Urban, R., Jacobs, J., Tomlinson, M., Gavrilovic, J., Black, J.

Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement

Journal of bone and joint surgery, Vol. 82-A, No.4, 457-477, 2000

18. Wang, J., Wicklund, B., Gustilo, R., Tsukayama, D.

Prosthetic metals interfere with the functions of human osteoblast cells in vitro

Clinical orthopaedics and related research, No.339, 216-226, 1997

## **7. Lebenslauf**

Name: Korth

Vorname: Kerstin

Geburtsdatum: 3.3.1976

Konfession: evangelisch

Geburtsort: München

Eltern: Dr. med. Uwe Korth, Rosemarie Korth, geb. Zeller

Schule: 1982 – 1995 Besuch der Freien Waldorfschule am Kräherwald in Stuttgart,  
1995 mit dem Abitur abgeschlossen

Studium: 1996 – 98 Vorklinik an der LMU München  
1998 – 02 Klinisches Studium der Medizin an der TU München, im November 2002 mit dem dritten Staatsexamen abgeschlossen

### **8. Danksagung**

Hiermit bedanke ich mich für die Unterstützung von Frau Tübel, ohne deren Hilfe die Laborarbeit nicht hätte zu Ende gebracht werden können bzw. erst gar nicht begonnen hätte werden können.

Des weiteren danke ich Prof. Dr. Gradinger für das Mut machen gegen Ende der Arbeit, als diese wegen vieler Schwierigkeiten zu scheitern drohte.

Ebenfalls Dank gebührt allen Mitarbeitern der Technischen Universität, die während der Laborkonferenzen immer gerne mit Rat und Tat zur Seite standen.

